Extrazelluläre Proteasen aus Mikroorganismen: Reinigung, Charakterisierung und Fixierung auf Polyester

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

2005

vorgelegt von

Saida Senhaji-Dachtler

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juli 2005

Dekan: Prof. Dr. S. Laufer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Bisswanger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Weser

In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,
die am Rande des Wissens hier und da ein Kiesel aufheben,
während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.

Sir Isaak Newton

Meinen Eltern
und Markus

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Bisswanger am Interfakultären Institut für Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Herrn Prof. Dr. Hans Bisswanger danke für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung in freundschaftlicher Atmosphäre. Mit ihm habe ich nicht nur ein Doktorvater in wissenschaftlicher Hinsicht gehabt, der mir jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand, auch seine stete Hilfsbereitschaft bei allen Probleme waren und sind von unschätzbaren Wert.

Herrn Prof. Dr. U. Weser danke ich für seine Unterstützung bei der Korrektur meiner Dissertation.

Für die Arbeitsmöglichkeit am Lehrstuhl II des Physiologisch-chemischen Instituts bedanke ich mich beim Herrn Prof. Dr. D. Mecke und Herrn Prof. Dr. H. Probst.

Bedanken möchte ich mich auch beim Herrn G. Grewe für die zahlreichen Fermentationen.

Ein besonderes Dankeschön gilt Dr. Meryem Nouaimi-Bachmann für die fachlichen Diskussionen und Freundschaft. In schwierigen Situationen stand sie mir immer zur Seite und zahlreiche schöne Stunden konnten wir miteinander verbringen.

Besonderer Dank gilt Paulina Rymkiewicz, Meike Kowallik, Helene Kupper und Philipp Schumann für Ihr tatkräftiges Engagement bei der Vielzahl an Versuchen.

Bedanken möchte ich mich bei meinen Arbeitskollegen Meriem Dzupinova, Manuela Jaklin, Elena Kracker, Sven Schaaf, Ulrike Scheu, Dr. Christa Steinbrenner und Dr. Christine Theiss für deren Hilfsbereitschaft und freundschaftliche Atmosphäre, die dazu beigetragen haben, diese Arbeit zu vollenden.

Ein Dankeschön ebenfalls an Frau Dr. A.Haberditzl im Zusammenarbeit am DFG Papierspaltprojekt.

Ein herzliches Dankeschön auch an Frau Schäfer und Klaus Möschel für ihre nette Hilfsbereitschaft.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinen Geschwistern für ihre uneingeschränkte Hilfe während meines Studiums.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Mann Markus für seine moralische Unterstützung und Liebe bedanken.

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG 1

1.1 Proteasen 1

1.1.1 Einteilung und Klassifizierung von Proteasen 2
1.1.1.1 Serin-Proteasen 2
1.1.1.2 Cystein-Proteasen 3
1.1.1.3 Aspartat-Proteasen 3
1.1.1.4 Metallo-Proteasen 3
1.1.1.5 Exo- und Endopeptidasen 3
1.1.2 Substratspezifität 4
1.1.3 Hemmstoffspezifität 4
1.1.4 Anwendung von Proteasen 5
1.1.5 Thermostabilität von Proteasen 7
1.1.6 Immobilisierung von Proteasen 9
1.1.6.1 Immobilisierung durch Einschlußverfahren 9
1.1.6.2 Immobilisierung durch Adsorption 10
1.1.6.3 Immobilisierung durch kovalente Bindung 10

1.2 Bakterienstämme zur Isolierung extrazelluläre Proteasen 12

1.2.1 Paenibacillus sp. 12
1.2.2 Extremophile Organismen 13
1.2.3 Anpassung an extreme Temperaturen 15
1.2.4 Phylogenetische Einteilung thermophiler Organismen 18
1.2.5 Thermophile Streptomyceten 19

2 PROBLEMSTELLUNG 22

3 ERGEBNISSE 23

3.1 Isolierung einer thermophilen extrazellulären Protease aus *S. thermovulgaris* 23

3.1.1 Reinheitsüberprüfung des Bakterienstamm 23

3.1.2 Stammhaltung von S. thermovulgaris 24
3.1.3 Optimierung der Kultivierungsbedingung..... 24
3.1.4 Konzentrierung des Kulturüberstand..... 26
3.1.5 Ionenaustauschchromatographie 26
3.1.6 Reinheitsbestimmung der isolierten Protease aus S. thermovulgaris..... 29
3.1.6.1 SDS-PAGE 29
3.1.6.2 Native Gelelektrophorese 32
3.1.6.3 Zymographie..... 33
3.1.7 Bestimmung der molekularen Masse durch Gelfiltration 34
3.2 Reinigung einer extrazellulären Protease aus Paenibacillus sp. 37
3.2.1 Zellkultivierung von Paenibacillus sp. 37
3.2.2 Ammoniumsulfatfällung und Dialyse 38
3.2.3 Gelfiltrationschromatographie an Sephacryl S-200 38
3.2.4 Reinheits- und Größenbestimmung der Protease aus Paenibacillus sp.... 41
3.2.4.1 SDS-PAGE 41
3.2.4.2 2D-Elektrophorese..... 44
3.2.4.3 Zymographie..... 47
3.2.5 Bestimmung der molekularen Masse durch Gelfiltration 48
3.2.6 Überblick über die Reinigungsverfahren der Proteasen aus S. thermovulgaris und Paenibacillus sp.... 51
3.3 Charakterisierung der extrazellulären Proteasen aus S. thermovulgaris und Paenibacillus sp.... 52
3.3.1 Substratspezifität 52
3.3.1.1 Benzoyl-arginin-p-nitroanilid (BAPNA) 52
3.3.1.2 Succinyl-phenylalanin-p-nitroanilid (SUPHEPA) und Benzoyl-tyrosin-p-nitroanilid (BTPA)..... 52
3.3.1.3 Benzoyl-tyrosin-ethylester (BTEE)..... 54
3.3.2 Enzymhemmung..... 57
3.3.2.1 S. thermovulgaris..... 57
3.3.2.2 Paenibacillus sp. 60
3.3.3 Bestimmung des pH-Optimums 64
3.3.3.1 S. thermovulgaris..... 64
3.3.3.2 Paenibacillus sp. 65
3.3.4 Temperaturabhängigkeit..... 66
3.3.4.1 S. thermovulgaris..... 66
3.3.4.2 Paenibacillus sp. 68
3.3.5 Temperaturstabilität..... 70
3.3.5.1 S. thermovulgaris..... 70

3.3.5.2 Paenibacillus sp. 72
3.4 Immunologische Untersuchungen 75
3.4.1 Produktion und Nachweis von Antikörper 75
3.4.1.1 Immunodiffusion nach Ouchterlony 75
3.4.1.2 Immunopräzipitation der Antigenlösung (Präzipitin-Reaktion) 76
3.4.2 Reinigung der Antikörper aus den Serum 78
3.4.3 SDS-Gelelektrophorese 79
3.4.4 Verwandtschaftsuntersuchungen mit anderen Proteasen 81
3.5 Immobilisierung der Protease aus S. thermovulgaris und Paenibacillus sp. an Trägermaterial 83
3.5.1 Aktivitätsmessung und Proteinbestimmung der immobilisierten Proteasen 84
3.5.2 Abbau von Gelatine 85
4 DISKUSSION 87
4.1 Extrazelluläre Proteasen aus S. thermovulgaris und Paenibacillus sp. 87
4.2 Stabilität der isolierten Proteasen 89
4.2.1 Größenbestimmung der isolierten Proteasen 90
4.3 Untersuchung der Spezifität der isolierten Proteasen 91
4.3.1 Substratspezifität 91
4.3.2 Enzymhemmung 92
4.4 Immobilisierung der isolierten Proteasen 93
4.5 Immunologische Untersuchungen 94
4.6 Ausblick 95
5 ZUSAMMENFASSUNG 96
6 MATERIALIEN UND METHODEN 98
6.1 Materialien 98
6.1.1 Bakterienstämme 98
6.1.2 Chemikalien 98
6.2 Methoden 100

6.2.1 Stammhaltung und Reinheitsüberprüfung von S. thermovulgaris 100
6.2.2 Fermentation von S. thermovulgaris 100
6.2.3 Reinigung der Protease aus S. thermovulgaris 101
6.2.3.1 Ammoniumsulfatfällung 101
6.2.3.2 Dialyse 102
6.2.3.3 Ionenaustauschchromatographie: 102
6.2.3.4 Proteinbestimmung 103
6.2.3.5 Ultrafiltration 105
6.2.4 Medien und Anzucht von Paenibacillus sp. 105
6.2.5 Reinigung der Protease aus Paenibacillus sp. 106
6.2.5.1 Ammoniumsulfatfällung und Dialyse 106
6.2.5.2 Gelfiltration an Sephacryl S-200 106
6.2.6 Elektrophoretische Methoden 107
6.2.6.1 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese 107
6.2.6.2 Diskontinuierliche Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen 109
6.2.6.3 Zweidimensionale Gelektrophorese 109
6.2.6.4 Proteolytische Aktivitätsbestimmung über die Zymographie 111
6.2.7 Größenbestimmung an Sephacryl S-200 112
6.2.8 Enzymtests 113
6.2.8.1 Azocasein 113
6.2.8.2 N-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid (BAPNA) 113
6.2.8.3 Succinyl-phenylalanin-p-nitroanilid (SUPHEPA) und Benzoyl-tyrosin-p-nitroanilid (BTPA) 114
6.2.8.4 N-Benzoyl-L-tyrosin-ethylester (BTEE) 114
6.2.8.5 Katalase 115
6.2.8.6 LDH 115
6.2.9 Bestimmung des pH Optimums 115
6.2.10 Immunologische Untersuchungen 116
6.2.10.1 Produktion von Antikörpern 116
6.2.10.2 Ammoniumsulfatfällung: 116
6.2.10.3 Anionenaustauscher: 117
6.2.10.4 Immunodiffusion nach Ouchterlony 117
6.2.10.5 Antigen-Antikörper Reaktion 117
6.2.11 Immobilisierung der Protease an Polyester 118
6.2.11.1 Aktivitätsmessung der immobilisierten Proteasen mit Gelatine als Substrat 118
6.2.11.2 Aktivitätsmessung der immobilisierten Proteasen mit dem Azocaseintest 118
7 LITERATUR 119

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN:

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATEE	Acetyltyrosinethylester
BAPNA	Benzoylarginin-p-nitroanilid
BzTyrpNA	Benzoyltyrosin-p-nitroanilid
BCA	4,4'-Dicarboxy-2,2'-bichinolin *(bicinchoninic acid)*
BSA	Rinderserumalbumin *(bovine serum albumine)*
BTEE	N-Benzoyl-L-tyrosinethylester
BTPA	Benzoyl-tyrosin-p-nitroanilid
c	Konzentration
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
d	Schichtdicke
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreit
ε	Absorptionskoeffizient
E-64	trans-Epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)-butan
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglyco-*bis*(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
IgG	Immunoglobuline der G-Klasse
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
kDa	Kilodalton
LDH	Lactatdehydrogenase
Maldi-TOF	Matrixunterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie, *time-of-flight*
MS	Massenspektrometrie
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduzierte Form)
NMR	Kernresonanzspektroskopie *(nuclear magnetic resonance)*
p.a.	*pro analysis*
PAGE	Polyacrylamid-gel-Elektrophorese
pI	Isoelektischer Punkt

PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*)
Pefabloc	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid-hydrochlorid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RT	Raumtempreatur
SDS	Natriumdodecylsulfat *(sodium dodecyl sulfate)*
sp.	Spezies
SUPHEPA	N-Succinyl-L-phenylalanin-p-nitroanilid
$T_{1/2}$	Halbwertszeit
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLCK	1-Chlor-3-tosylamido-7-amino-2-heptanon-HCl
TPCK	1-Chlor-3-tosylamido-4-phenyl-2-butanon
TRIS	Tris-Hydroxymethylaminomethan
U	Unit (µmol/min)
UV	Ultraviolett
U/min	Umdrehung pro Minute
v	Reaktiontsgeschwindigkeit
V_e	Elutionsvolumen

1 Einleitung

1.1 Proteasen

Fortschritte in der Protein- und Peptidanalytik haben gezeigt, dass Enzyme hochselektive Modifikationen von Proteinen mit spezifischer Funktionalität aufweisen (Gemeiner, 1992). So kommen Enzyme aufgrund ihrer großen Diversität bei einer Fülle von Vorgängen innerhalb der Organismen zum Einsatz, angefangen vom zellulärem Niveau bis hin zu Lebewesen, beispielsweise zur Entwicklung von Kaskadesystemen, wie der Hämostasis und bei Entzündungen.

Für die technische Anwendung weisen Enzyme meist Eigenschaften auf, die einen Einsatz industriell erschweren. So sind etwa ein Drittel aller bekannten Enzyme mit biologischen Membranen verbunden und in isolierter Form weniger stabil. Viele Oxidoreduktasen, Transferasen, Ligasen und Synthasen benötigen zu ihrer Funktion Cofaktoren, die aus Kostengründen eine technische Anwendung der Enzyme erschweren. Proteasen hingegen, die zur Gruppe der Hydrolasen zählen, können direkt zur Expression gebracht werden und sind daher von grossen Interesse für die industrielle Nutzbarkeit (Daniel *et al*., 1981; Cowan *et al*., 1985). Zusätzlich zur direkten Anwendbarkeit müssen die Proteasen einfach zu isolieren sein, da für technische Prozesse große Enzymmengen gebraucht werden. Daher kommen meist extrazelluläre, in das umgebende Milieu segregierte Proteasen zum Einsatz.

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Anwendung von Enzymen in der Industrie ist deren Stabilität. Die Aktivität muss unter den Bedingungen des technischen Prozesses eine angemessene Zeit, zumindest einige Monate, erhalten bleiben. Gegebenenfalls wird man versuchen, die Enzymaktivität zu stabilisieren, wobei die Immobilisierung eine wichtige Rolle spielt. Auch vom Einsatz thermophiler Enzyme verspricht man sich eine gesteigerte Langzeitstabilität, wie auch kostengünstigere und höhere Produktionsraten aufgrund erhöhter Temperaturen während des Produktionsprozesses,

beispielsweise durch den Verzicht von Kühlvorgänge, sowie durch eine bessere Löslichkeit von Substraten (Bruins, 2001). Ein bedeutsames Beispiel hierfür ist die Verwendung der taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* bei der PCR-Methode (Engelke *et al*, 1990). Gleichzeitig verringert der Einsatz thermophiler Organismen den Aufwand hinsichtlich der Sterilität bei technischen Prozesse, z.B. bei Fermentationen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Gewinnung von Proteasen, die sich für die Immobilisierung an Trägermaterialien und damit für technische Anwendungen eignen. Die Proteasen sollten einfach zu isolieren sein und eine hohe Stabilität aufweisen. Solche Eigenschaften sind besonders bei Exoenzymen, die vom Organismus aktiv in das Medium ausgeschieden werden, zu erwarten. Verschiedene Mikroorganismen segregieren Proteasen an das Medium, um dort befindliche Proteine in Aminosäuren zu spalten, die wiederum als Nahrungsstoffe in die Zelle aufgenommen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden dafür Proteasen aus zwei leicht zu kultivierenden Mikroorganismen untersucht. Der noch nicht genau klassifizierte Stamm *Paenibacillus sp.* diente als Beispiel eines bei normalen Temperaturen wachsenden Organismus, *Streptomyces thermovulgaris* ist ein Beispiel eines thermophilen Stammes.

1.1.1 Einteilung und Klassifizierung von Proteasen

Nach der Nomenklatur der *Commission of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* werden die Proteasen der dritten Hauptklasse der Enzyme, den Hydrolasen zugeordnet. Nach dem Aufbau ihres aktiven Zentrums werden sie in vier Gruppen eingeteilt, die Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metallo-Proteasen.

1.1.1.1 Serin-Proteasen

Zu den Serin-Proteasen zählen Trypsin, Chymotrypsin und Elastase. Drei Aminosäurereste, nämlich Asp-102, His-57 und Ser-195, bilden im aktiven Zentrum des Enzyms (Chymotrypsin) eine katalytische Triade (Neurath, 1985). Bei der Hydrolyse eines Peptids durch eine Serin-Protease kommt es durch Acylierung des Substrats zur Bildung eines tetraedrischen Übergangszustands, wodurch die

Abtrennung der Aminogruppe des Substrates ermöglicht wird. In einem zweiten Schritt findet eine Deacylierung über einen tetraedrischen Übergangszustand statt. Nach der Hydrolyse ist das Enzym wieder für eine neue Katalyserunde bereit.

1.1.1.2 Cystein-Proteasen

Zu den auch als Sulfhydryl-Proteasen bezeichneten Cystein-Proteasen zählen Papain und Cathepsin. Im aktiven Zentrum des Papain befinden sich die Aminosäuren Asp-174, His-158 und Cys-25. Die Katalyse verläuft über einen intermediären Thioester.

1.1.1.3 Aspartat-Proteasen

Die Aspartat-Proteasen werden auch als saure oder Carboxyproteasen bezeichnet. Typische Vertreter dieser Proteaseklasse sind Pepsin und Rennin. Im aktiven Zentrum des Penicillopepsin z.B. befinden sich die katalytisch wirksamen Aminosäurereste Asp-32 und Asp-213. Diese Proteasen sind nur unter pH 5 aktiv.

1.1.1.4 Metallo-Proteasen

Diese Klasse von Proteasen sind nur in Gegenwart von Metall-Ionen wie Zn^{2+}, Ca^{2+} wirksam. Diese Metallionen können auch der Aufrechterhaltung der nativen Enzymstruktur dienen. Beispiele für Metallo-Proteasen sind Collagenase, Carboxypeptidase A und Thermolysin. Im aktiven Zentrum der Metallo-Protease (Carboxypeptidase A) befindet sich neben dem Metallion Zn die Aminosäuren His-196, His-69 und Glu-72.

1.1.1.5 Exo- und Endopeptidasen

Neben der oben erwähnten Einteilung der Proteasen nach katalytisch wirksamen Gruppen im aktiven Zentrum lassen sich die Proteasen auch nach der Lokalisation ihres Angriffs an der zu spaltenden Peptidkette in Exo- und Endopeptidasen unterteilen. Während Exopeptidasen als Amino- oder Carboxypeptidasen ausschließlich endständige Aminosäuren abspalten, hydrolysieren Endopeptidasen bevorzugt im Inneren des Proteinmoleküls. Zusätzlich sind Endopeptidasen befähigt, niedermolekulare Peptide, synthetische Aminosäureester und Amide auch endständig zu spalten.

1.1.2 Substratspezifität

Bei der Neuisolierung von Proteasen ist es vielfach vorteilhaft, unspezifische Enzymtest zu verwenden, die praktisch alle Proteaseaktivitäten erfassen. Man bedient sich dabei zumeist natürlicher Proteine oder Peptide wie Hämoglobin und Casein als Substrate, die zahlreiche zugängliche Peptidbindungen unterschiedlichster Art enthalten (Anson, 1939; Brock, 1982). Will man jedoch bestimmte Proteasen zuordnen, so empfiehlt sich das Studium der Substratspezifität, also welche Aminosäureverknüpfungen durch welche Protease gespalten werden. Für lösliche Proteasen wurden in der Fachliteratur bisher über 50 verschiedene Enzymtests beschrieben (Bisswanger, 2003). Zur exakten Charakterisierung der Spezifität isolierter Proteasen werden synthetische Substrate mit klar definierten Peptidbindungen und Aminosäureresten verwendet. Spezifische Substrate für Proteasen vom Chymotrypsin-Typ spalten bevorzugt an den aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan, und Phenylalanin, aber auch bei Leucin. Typische Vertreter dieser Substrat-Klasse sind *N*-Succinyl-L-phenylalanin-p-nitroanilid (SUPHEPA) und Benzoyl-tyrosin-p-nitroanilid. Beiden Substraten ist die an die Aminosäure gebundene Nitroanilidgruppe gemeinsam, bei deren Abspaltung durch die katalytische Reaktion eine typische Gelbfärbung ersteht. Nach dem gleichen Prinzip funktioniert Benzoylarginin-p-nitroanilid (BAPNA), welches durch Proteasen mit trypsin-ähnliche Spezifität gespalten wird. Substrate für Proteasen vom Trypsin-Typ werden bevorzugt an den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin gespalten.

1.1.3 Hemmstoffspezifität

Die Zuordnung von Proteasen lässt sich durch die Verwendung geeigneter Hemmstoffe weiter analysieren. Bestimmte Hemmstoffe, wie Leupeptin, 1-Chlor-3-tosylamido-7-amino-2-heptanon-HCl (TPCK) und 1-Chlor-3-tosylamido-4-phenyl-2-butanon-HCl (TLCK), reagieren in gleicher Weise mit Serin- und Cysteinproteasen. Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) dagegen wird als Suicid-Substrat kovalent in Serinproteasen eingebaut und bewirkt eine irreversible Inaktivierung des Enzyms (James, 1978). Ein spezifischer Hemmstoff für Cysteinprotease ist *trans*-

Epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)-butan (E64). Als Inhibitoren von Metallo-Proteasen werden Komplexbildner wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und das für Calciumionen spezifische Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure (EGTA) verwendet, die sowohl in der Katalyse essentielle wie strukturell stabilisierende Metallionen abfangen.

Die Unterscheidung zwischen der reversiblen und irreversiblen Hemmung lässt sich durch Bestimmung der Zeitabhängigkeit der Hemmwirkung untersuchen. Der reversible Hemmstoff zeigt gegenüber dem ungehemmten Enzym eine augenblickliche Reduktion der Enzymaktivität, die sich zeitlich nicht weiter verändert. Ein irreversibler Hemmstoff bewirkt dagegen einen zeitabhängigen, zumeist meist exponentiellen Abfall der Enzymaktivität. Irreversible Hemmstoffe sind PMSF und E 64.

1.1.4 Anwendung von Proteasen

Bereits heute finden Proteasen aufgrund ihrer bestimmten Spezifizierungen und Stabilitäten eine große Breite von Applikationen in der Konsumgüterindustrie. Der geschätzte weltweite Jahresumsatz industriell genutzter Enzyme beträgt über 1 Mrd Euro, wobei Proteasen (Cowan, 1991; Daniel *et al.*, 1985) mit 60% den weitaus größten Anteil industriell genutzter Enzyme darstellen. Abb. 1 zeigt eine Übersicht der industriell verwendeten Enzyme.

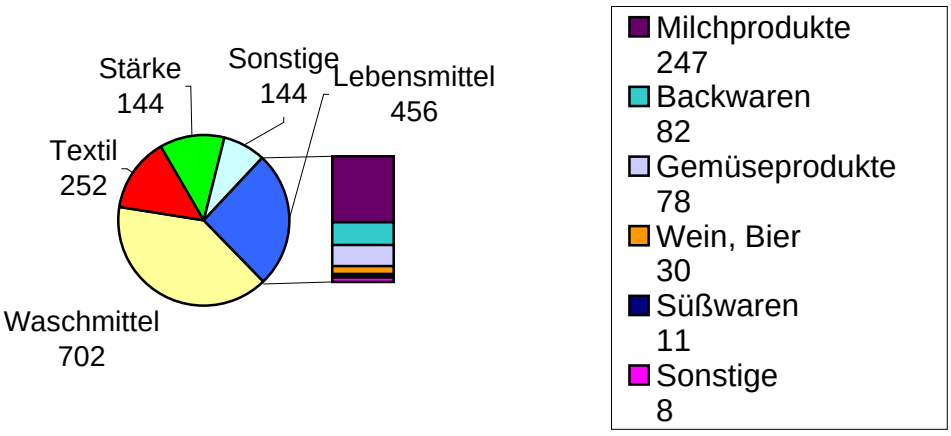

Abb. 1: Weltmarkt für industrielle Enzyme 1994 (Umsatz in Mio DM).

Die größte Bedeutung haben die alkalischen Bakterienproteasen, die in Waschmitteln eingesetzt werden, sowie Enzyme zur Herstellung hochwertiger Zellfasern für die Textilbranche. Da Wolle vorwiegend aus Proteinen und Lipiden besteht, kommen zur Behandlung von Wolle hauptsächlich Proteasen und Lipasen in Betracht.

Mit der biotechnologischen Produktion stärkeabbauender Enzyme wurden enzymatische Verfahren zur Produktion von Glucose- und Fructosesirup entwickelt, welche in der Lebensmittelindustrie große Bedeutung besitzen. Ferner finden bei der milchverarbeitenden Industrie die caseinfällenden Labenzyme Rennin und Chymosin zur Käseherstellung breite Verwendung. Weiterhin sind das aus pflanzlichem Ursprung gewonnene Papain für die Bierstabilisierung und Fleischzartmachung, sowie Pankreasproteasen für die Lederindustrie sehr wichtig.

Weltweite Anstrengungen zur Erforschung und Entwicklung innovativer physiologischer und biotechnischer Applikationen haben auch das Interesse an thermophilen Enzymen geweckt. Bereits 1955 wurde α-Amylase aus *B. stearothermophilus* als erstes thermophiles Enzym industriell angewandt (Campbell, 1955). Spezielle Anwendungsgebiete thermophiler Enzyme, wie Lipasen, Proteasen und Cellulasen, finden sich in der Papierindustrie, z. B. in der enzymatischen Papierbleichung bei der Altpapieraufbereitung. Desweiteren werden thermophile Proteasen beim Papierspaltverfahren, einer wichtigen Methode für die Restaurierung geschädigter Bücher und Dokumente, eingesetzt (Senhaji, 2000).

Heutzutage sind in der medizinischen Forschung und Anwendung thermophile Enzyme nicht mehr weg zu denken. Als Beispiel sei auf den bereits oben erwähnten Einsatz thermostabile DNA-Polymerasen bei der PCR-Methode hingewiesen, bei dem die Enzyme bei hohen Temperaturen nicht inaktiviert werden, sondern vielmehr ihre optimale Aktivität entfalten. Proteasen haben in jüngster Zeit auch großes Interesse bei der Entwicklung therapeutischer Medikamente gegen Krebs und AIDS gewonnen (Pantazaki *et al.*, 2002 ; Price, 1983).

1.1.5 Thermostabilität von Proteasen

In den letzten Jahrzehnten wurden die Zellbestandteile von Mikroorganismen, wie die Membran, sowie die Proteine und Nukleinsäuren, eingehend untersucht, um deren Thermostabilität zu erklären (Jaenicke, 2000). Die Untersuchung der DNA von thermophilen Organismen ergab einen hohen Gehalt an Guanin und Cytosin. Aufgrund der hohen Zahl an Wasserstoffbrückenbindungen zwischen diesen Basen wurde eine erhöhte Schmelztemperatur der Nucleinsäure festgestellt (Brock, 1978). Ebenso wurde nachgewiesen, dass mit höherer Wachstumstemperatur der Gehalt an Lipiden in der Membran steigt. Die Stabilität steigt dabei durch die erhöhte Anzahl an Esterbindungen (Adams, 1995). Auch bei Proteinen findet eine Anpassung an extreme Umweltbedingungen hinsichtlich der Struktur und Aminosäurezusammensetzung statt.

Die gewonnenen Erkenntnisse werden mit dem Ziel genutzt, weniger stabile Proteine durch Methoden des Molecular Modellings und durch Protein Engineering in stabilere Proteine umzuwandeln und sie somit für technische Anwendungen brauchbar zu machen. Durch gezielte Aminosäureaustausche werden die entsprechenden Proteine bzw. Enzyme so modifiziert, dass sich die durch chemische Reaktionen, z.B. oxidative Prozesse und Proteolyse verursachte Instabilität der Proteine verringert und damit deren Thermostabilität erhöht. Dazu wurden homologe Proteine aus mesophilen und thermophilen Stämmen isoliert und deren Eigenschaften durch vergleichende Studien untersucht (Oshima & Imahori, 1974). Auffallenderweise ergaben sich nur geringe Veränderungen in der Zusammensetzung der Aminosäuren. Jedoch belegten die Studien, dass die thermophilen Proteine eine höhere Packungsdichte in der Proteinstruktur haben. Dies ist hauptsächlich durch den höheren Gehalt an den Aminosäuren Prolin und Alanin erklärbar. Ebenso vermindert ein geringerer Anteil an Glycin die Anfälligkeit gegenüber thermischer Auffaltung (Hough & Danson, 1999). Auch durch den Austausch der Aminosäure Valin, Serin und Threonin gegen Alanin sowie Aspartat gegen Glutamin konnte eine Stabilisierung bewirkt werden (Kotsuka *et al.,* 1996). Eijsink (1991) gelang es, die Thermostabilität einer Protease aus *Bacillus stearothermophilus* durch den Austausch von Asparagin mit Leucin soweit zu erhöhen, dass die Protease sogar hyperthermophile Eigenschaften besaß.

Es wird angenommen, dass die Thermostabilität von Proteinen nicht nur von einem Faktor abhängt, sondern auf mehrere unterschiedliche Wechselwirkungen (z.B. hydrophobe und ionische Wechselwirkungen) zurück zu führen ist, die eine geringere Flexibilität innerhalb des Proteins bewirken (Alber, 1989; Dill, 1990). Eine Stabilisierung durch Erhöhung solcher Wechselwirkungen konnte mit Subtilisin und α-Amylase als Modellenzyme erreicht werden (Nielsen & Borchert, 2000). So war es möglich, Subtilisin aus *B. licheniformis* durch Anhängen von Fettsäurereste hydrophober und somit thermostabiler zu machen (Plon & Ballesteros, 1994; Bryan, 2000).

Da im allgemeinen eine Reduktion von natürlicherweise im Protein vorhandenen Disulfidbrücken eine starke Destabilisierung bewirkt, wurde angenommen, dass Proteine durch gentechnisches Einführen von Disulfidbrücken zu stabilisieren sind (Pace *et al.*, 1998, Toogood *et al.*, 2000). So konnten Mansfeld *et al.* (1997) eine Thermolysin-ähnliche Protease durch Cystein-Mutationen weiter stabilisieren. Nach Einführen der Cysteinreste an die durch Molecular Modelling ermittelten Orte in der Proteinstruktur formte sich die Disulfidbrücke *in vivo* spontan. In der Praxis zeigte die Strategie der Einführung von Disulfidbrücken jedoch unterschiedliche, teilweise sogar destabilisierende Resultate. Letztere sind darin begründet, dass die Erhöhung der Temperatur die Oxidation der Disulfidbrücken begünstigt (Betz, 1993). Entscheidend für die Stabilisierung ist die richtige Positionierung der Disulfidverbrückung innerhalb der Proteinstruktur (Creighton, 1988). Der Erfolg der Verbesserung der Stabilität der Protease von Mansfeld *et al.* (1997) ist wahrscheinlich darin begründet, dass an der Stelle der Mutation die Möglichkeit einer reversible Entfaltung aufgehoben ist. Da letztere einer katalytischen Autoprotolyse vorausgeht, kann so die Stabilität des Proteins erhöht werden (Sakiyama, 1989).

Schließlich spielen bei der Thermostabilisierung von Zellen Stress- oder Hitzeschockproteine, sogenannte *Molekulare Chaperone,* eine zentrale Rolle. So besteht bei dem hyperthermophilen Vertreter *Pyrodictium occultum* das lösliche Zellprotein über 80% aus Chaperonen. Solche Hitzeschockproteine sind für die Reparatur von Proteinketten, die sich unter Zellstress, wie hoher Temperatur, fehlgefaltet haben, verantwortlich (Buchner, 2002).

1.1.6 Immobilisierung von Proteasen

Ein weiterer Ansatz um die Stabilität von Proteinen zu erhöhen ist deren Immobilisierung an spezielle Trägermaterialien (Ulbrich-Hofmann *et al.* 1989). Immobilisierte Enzyme werden bevorzugt in der Industrie eingesetzt, da sie vielfach unempfindlicher sind gegen thermische, chemische oder physikalische Einflüsse als die entsprechenden Enzyme in löslicher Form, auch wird die Autoproteolyse durch die Fixierung an feste Trägermaterialien eingeschränkt. Nouaimi *et al*. (2003) zeigten, dass immobilisiertes Trypsin signifikant stabiler war gegenüber äußeren Einflüssen wie Temperatur, pH und Lösungsmittel. Ein weiterer Vorteil immobilisierter Enzyme ist deren Wiederverwendbarkeit, da sie nicht mit der Reaktionslösung verloren gehen. Dadurch lassen sich technische Prozesse kostengünstiger gestalten. Die Fixierung der Enzyme erfolgt durch chemische oder physikalische Bindungen an geeignete Trägerstoffe. In technischen Verfahren werden hauptsächlich die im Folgenden beschriebenen Immobilisierungsarten angewandt (Senhaji, 2001).

1.1.6.1 Immobilisierung durch Einschlußverfahren

Enzyme können entweder in Mikrokapseln eingeschlossen oder in der Netzstruktur von Gelen gefangen werden. In beiden Fällen geht man in der Regel so vor, dass sich ein polymeres Gerüst in der Enzymlösung ausbildet, wobei die Poren nicht für die Enzyme, aber für die Substrate passierbar sein müssen. Als Membranmaterial für Mikrokapseln verwendet man vor allem Polyamide wie Nylon, Polymere aus Cellulosenitrat, sowie aus Algen gewonnene Polysaccharide (Alginat, Carragenan). Anwendung findet diese Immobilisierungsart beispielsweise als Arzneistoffträger (Schreier, 1984).

Bei den Gel-Einschluss-Verfahren werden die Enzyme in eine Netzstruktur von Polymeren, wie Gelatine und Polyacrylamide eingebettet (O'Driscoll, 1976). Mit dieser Methode lassen sich auch ganze Zellen immobilisieren.

Der Vorteil der Einschluss-Verfahren liegt darin, dass sich die native Enzymstruktur bei dieser Art von Immobilisierung nicht ändert. Jedoch kommt es häufig zur ungewollten Freisetzung des Enzyms. Auch ist die Diffusion des Substrats zum Enzym und des entstehenden Produkts aus der unmittelbaren Umgebung des Enzyms behindert, so dass Substratverarmung beziehungsweise Produkthemmung die Enzymaktivität vermindern. Dies gilt ganz besonders für hochmolekulare Substrate, daher eignet sich dieses Verfahren wenig für die Immobilisierung von Proteasen.

1.1.6.2 Immobilisierung durch Adsorption

Bei dieser Methode werden Enzyme durch nicht-kovalente, ionische und nicht-ionische hydrophobe oder adsorptive Wechselwirkung an die Matrix fixiert. Dabei kommen Kationen- und Anionenaustauscher als ionische Träger zum Einsatz, als nicht-ionische Träger werden Aktivkohle, Kieselgel, Aluminiumoxid und Hydroxylapatit verwendet. Aufgrund schwacher Adsorptionskräfte kann es leicht zu Desorptionen kommen. Der große Vorteil der Adsorption ist die einfache und schonende Anwendbarkeit, auch lässt sich das Enzym zur Regeneration des Trägers leicht von der Matrix eluieren.

1.1.6.3 Immobilisierung durch kovalente Bindung

Die am häufigsten angewandte Methode ist die Immobilisierung über kovalente chemische Bindungen. Als Beispiel sei die Immobilisierung der Lactat-Oxidase an Cellulose zur Milchsäureanalyse erwähnt (Cannon *et al.*, 1984).

Die kovalente Bindung erfolgt zumeist mit dem aktivierten Trägermaterial über reaktiven Aminosäurereste des Proteins. Je nach Aktivierung des Trägers und Art der Verknüpfung existieren eine Vielzahl unterschiedlicher Möglichkeiten der Immobilisierung an und es ist die Aufgabe, die für ein spezielles Protein geeigneteste Methode heraus zu finden. Die kovalente Immobilisierung besitzt zwar den Vorteil großer Stabilität, setzt aber häufig die Aktivität des Enzyms herab.

Eine Variante der kovalenten Fixierung an feste Trägermaterialien ist die Quervernetzung. Mit Hilfe von bifunktionellen Substanzen, wie Glutardialdehyd oder Diisothiocyanat, werden die Enzymmoleküle, teilweise unter Beimengung inerter Proteine, wie Serumalbumin, über intermolekulare, kovalente Bindungen zu großen Aggregaten verknüpft. In Membranreaktoren lassen sich die Reaktionsprodukte durch geeignete Filter abtrennen, während die großen Enzymaggregate in der Reaktionslösung zurückgehalten werden. Dadurch wird ein kontinuierlicher Reaktionsverlauf gewährleistet. Nachteilig wirkt sich allerdings bei dieser Technik aus, dass viele Enzyme bei der Quervernetzung durch schädigende Einflüsse der Kopplungssubstanzen an Aktivität verlieren.

1.2 Bakterienstämme zur Isolierung extrazelluläre Proteasen

In dieser Arbeit wurden zur Isolierung von Proteasen die Bakterienstämme *Paenibacillus sp.* und *S. thermovulgaris* ausgewählt. Die Besonderheiten dieser Stämme und die Gründe für deren Auswahl werden kurz dargestellt.

1.2.1 *Paenibacillus sp.*

Stäbchenförmige, aerobe, endosporenbildende Bakterien wurden früher aufgrund ungenauer Differenzierung der Gattung *Bacillus* zugeordnet. Genauere Studien der 16s rRNA-Sequenz zeigten jedoch, dass die Gattung *Bacillus* aus mindestens 10 phylogenetischen Gruppen besteht. Fünf dieser Gruppen wurden neu klassifiziert, nämlich in die Gattungen *Alicyclobacillus, Aneuribacillus, Halobacillus, Brevibacillus* und *Paenibacillus* (Shida *et al*., 1997; Claus & Berkeley, 1986).

Die Gattung *Paenibacillus* wurde von Ash *et al.* (1991) genauer beschrieben. Derzeit sind 11 Spezies dieser Gattung bekannt. Die Organismen dieser Gattung zählen zur Gruppe der Gram-positiven Bodenbakterien. Sie sind fakultativ anaerobe Sporenbildner, sind meist begeißelt und haben einen relativ hohen GC-Gehalt von 45-54% (Shida *et al.*, 1997).

Besonders interessant ist der in nigerianischen Bodenproben gefundene Bakterienstamm *Paenibacillus sp.*, da dieser einfach zu isolierende extrazelluläre Enzyme produziert. So wurde von Moneke (1998) aus *Paenibacillus sp.* eine extrazelluläre Xylose-Isomerase isoliert, die zugleich thermophile Eigenschaften besitzt. Doukyu *et al*. (2003) reinigten eine extrazelluläre thermophile Cyclodextrin-Glucanotransferase mit einem Temperaturmaximum bei 60°C. Abb. 2 zeigt eine mikroskopische Aufnahme einer Zelle von *Paenibacillus sp.*

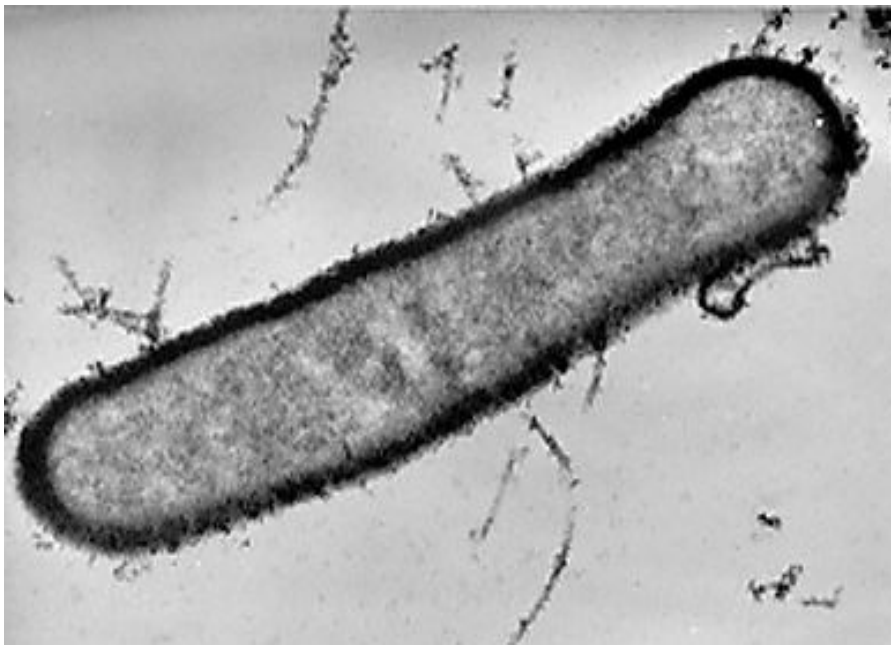

Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Paenibacillus sp.*

1.2.2 Extremophile Organismen

Alle Lebewesen vermögen ihre Lebensfunktionen nur innerhalb von speziellen klimatischen Bedingungen und definierten Umgebungseinflüssen zu entfalten. Für den Menschen sind beispielsweise ein Atmosphärendruck von 1 bar, eine Temperatur von etwa 20 - 25°C, eine relative Luftfeuchtigkeit von 60-70%, sowie ein neutraler pH ideal. Solche oder ähnliche Bedingungen gelten auch für die Mehrzahl aller Lebewesen und entsprechend bezeichnet man Organismen, die im gemäßigten Temperaturbereich zwischen 20 und 45°C leben als *mesophil*. Allerdings finden sich auch Lebewesen, die sich anderen, von uns als extrem empfundenen Bedingungen angepasst haben. Insbesondere sind Mikroorganismen in der Lage, jenseits der gewöhnlichen Umweltbedingungen zu existieren. Man bezeichnet sie als *Extremophile*, entsprechend ihren Fähigkeiten, sich an kalte (*psychrophile*), heiße (*thermophile*), saure (*acidophile*), basische (*alkalophile*) oder stark salzhaltige (*halophile*) Lebensbedingungen anzupassen (s. Abb. 3). *Barophile* Organismen hingegen leben unter Konditionen hohen hydrostatischen Druckes in marinen Lebensräumen.

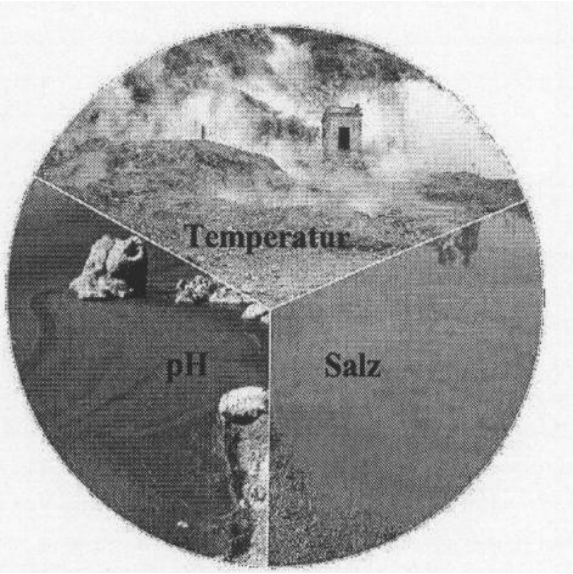

Abb. 3: Einteilung der belebten Welt in extreme Lebensräume (Titelblatt aus: Biotechnology of Extermophiles, 1993).

Extremophile Mikroorganismen finden sich in schwefligen oder sauren heißen Quellen vulkanischen Ursprungs, alkalischen Gewässern, Salzseen, Gletschern und arktischen Hochseegebieten. Genau so vielfältig wie der Lebensraum von Extermophilen ist, sind auch deren Anpassungsmechanismen. So hat das halophile Bakterium *Halobacterium halobium* sich bezüglich seiner Struktur und seines Stoffwechsel ganz auf seinen Lebensraum in extrem salzhaltigen Seen eingerichtet. Während andere Organismen unter diesen Bedingungen infolge des hohen Salzgehaltes unweigerlich austrocknen würden, schützen sich die halophilen Organismen durch einen relativ höheren Salzgehalt im Zellplasma gegen den starken osmotischen Druck und ein äußerst leistungsfähiges energieliferndes System, das Bacteriorhodopsin, welches bis zu 75% ihre Membranmasse ausmacht. An das Bacteriorhodopsin ist ein Retinalmolekül gekoppelt. Dieses wird bei einer Wellenlänge von 570 nm angeregt, wodurch sich seine Konformation ändert. Dadurch wird ein Protonengradient erzeugt, welches der Synthese von ATP dient (Bone et *al.*, 1996).

Der in vulkanischen Gebieten lebende Bakterienstamm *Sulfolobus solfataricus* hat sich nicht nur den extremen Temperaturen von 85°C angepasst, sondern vermag auch in der schwefelsauren Umgebung unter pH 5 zu wachsen. Demgegenüber versteht es *Bacillus alcaliphilus*, bei einem stark alkalischen pH-Wert von 11,5 zu überleben, während *Flavobacterium islandicum* sowohl den psychrophilen Bedingungen, wie auch dem in der Tiefsee herrschenden hohem Druck standhält (Tadao *et al*., 2001).

Extremophile Organismen sind einerseits von besonderem Interesse für das Studium von Mechanismen zur Anpassung an extreme Umweltbedingungen und zur Stabilisierung der Zellkomponenten. Andererseits verspricht die zu erwartende besondere Stabilität insbesondere der Proteine und Enzyme solcher Organismen die Möglichkeit breiter Anwendungen in technischen Prozessen.

1.2.3 Anpassung an extreme Temperaturen

Für jedes Lebewesen, ob es bei den für uns als normal empfundenen Temperaturen oder in extremen thermischen Bereichen existiert, gilt, dass es seine Lebensfunktionen nur innerhalb eines eng begrenzten Temperaturbereichs optimal entfalten kann, der sich dem Klima, in dem es lebt, anpasst. So besitzt jeder Organismus ein bestimmtes Temperaturoptimum, bei dem er am besten gedeiht. Bei Temperaturen unterhalb des Optimums verlangsamt sich das Wachstum entsprechend der Temperaturdifferenz. Bei größerem Abstand zum Optimum kann bei bestimmten Organismen sogar Kältetod eintreten. Bei Temperaturen oberhalb des Optimums ist die Toleranzgrenze sehr viel enger und bereits wenige Grad über dem Maximum tritt der Tod ein. Diese geringe Toleranz ist hauptsächlich auf die irreversible Denaturierung von Proteinen zurückzuführen. Die einzelnen Temperaturoptima können sich je nach Organismus allerdings erheblich unterscheiden und reichen von Minusgraden bis über den Kochpunkt des Wassers. Auf die Einteilung der Organismen nach ihren optimalen Wachstumstemperaturen wurde bereits eingegangen. Eine noch genauere Unterteilung der Temperaturbereiche lebender Organismen ist in Abb. 4 gezeigt (nach Farrell, 1969).

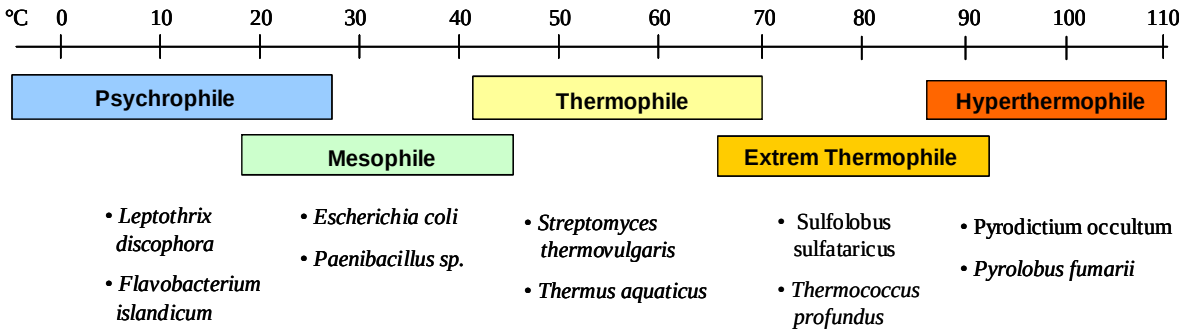

Abb. 4: Einteilung der Bakterien nach ihren optimalen Wachstumstemperaturen (oben), sowie repräsentative Vertreter (unten).

Psychrophile Organismen findet man vorwiegend in polaren Gewässern und der Antarktis (Ackermann, 1992, Hausmann & Kremer, 1994). Die Temperatur im Jahresmittel liegt hier nur knapp über dem Gefrierpunkt und kann in Polarnächten bis –60°C fallen. Fogg (1967) untersuchte die Grünalgen *Chlamydomonas nivalis* und *Chlorosphaera antartica* und fand heraus, dass die Algen durch Sporenbildung bis zu –70°C ertragen können. Ein Vertreter psychrophiler Mikroorganismen ist *Leptothrix discophora*, der bei Temperaturen zwischen 10-30°C zu existieren vermag.

Die meisten in Böden und im Wasser lebenden Bakterien sind mesophil und erreichen ihre maximale Wachstumsrate bei 20-45°C. Bekannte Vertreter mesophiler Organismen sind das Gram-negative Darmbakterium *Escherichia coli*, das Gram-positive Bakterium *Bacillus subtilis* und auch der in dieser Arbeit behandelte Bakterienstamm *Paenibacillus sp.* ist dieser Gruppe zuzurechnen.

Thermotolerante Organismen bilden ein Bindeglied zwischen mesophilen und thermophilen Organismen. Sie wachsen in der Regel im mesophilen Temperaturbereich, können aber bis zu einem gewissen Grade auch noch höhere Temperaturen um 45-50°C akzeptieren. Organismen mit Wachstumsoptima zwischen 50° und 65°C bezeinet man als *moderat thermophil*, während *thermophile* Organismen optimal bei 65-75°C gedeihen. Als Beispiele seien die Bakterien *Thermus aquaticus* und der hier verwendete Stamm *S. thermovulgaris* genannt (Brock, 1969; Farrell, 1969; Kim *et al.*, 1999).

Als extrem thermophil bezeichnet man Organismen mit Temperaturoptima von 70-90°C. Sie wurden in vulkanischen Gebieten, in heißen Quellen, in Schwefelthermen und im Schlamm von Thermalbädern nachgewiesen (Singleton & Amelunxen, 1973). Typische Vertreter diese Gruppe sind das Archaebacterium *Thermococcus profundus*, das Eubakterium *Thermotoga maritima* und der bereits erwähnte Stamm *Sulfolobus sulfataricus* (Zillig *et al*., 1980). *Hyperthermophil*e Organismen, wie *Pyrodictium occultum* wachsen bei Temperaturen bis zu 110°C und entsprechend erhöhtem Druck. Solche Bakterien wurden in unterseeischen Kavernen beim Austritt heißer Quellen gefunden (Stetter, 1983).

1.2.4 Phylogenetische Einteilung thermophiler Organismen

Durch den Vergleich von Sequenzen der 16S-rRNA lassen sich Verwandtschaftsbeziehungen zwischen verschiedenen Organismen erkennen. Auf diese Weise war es möglich, eine phylogenetische Klassifizierung thermophiler Organismen zu erstellen (Daniel & Danson, 1995). Wie in Abb. **5** schematisch dargestellt, unterscheidet man die drei Hauptgruppen Eubakterien, Archaeabakterien und Eukaryonten (Woese, 1996).

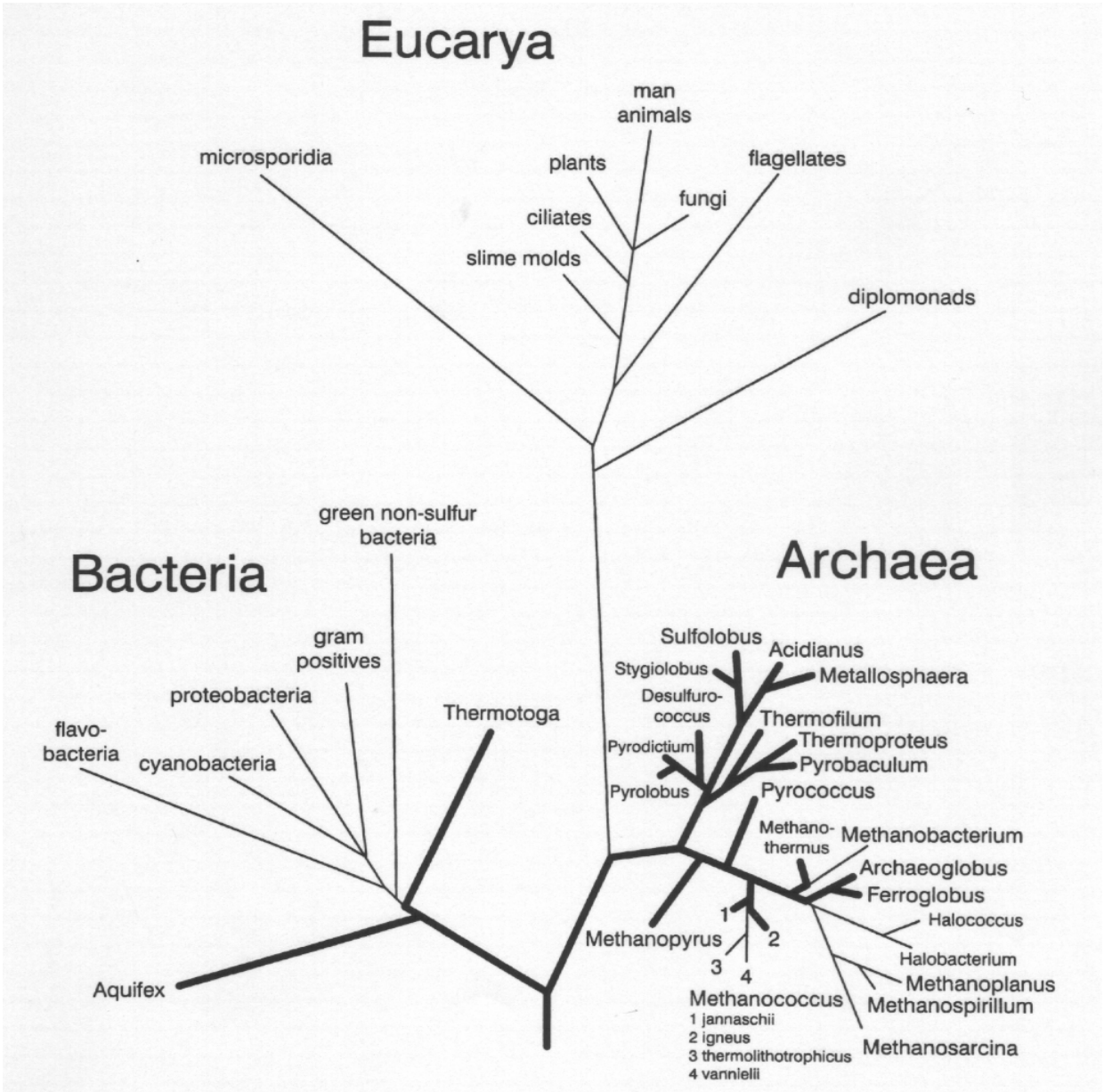

Abb. 5: Phylogenetische Klassifizierung thermophiler und hyperthermophiler Mikroorganismen (nach Woese *et al.*, 1990).

Ein großer Teil der thermophilen Bakterien wird taxonomisch den Archaeabakterien zugeordnet, deren Name darauf hinweist, dass im archaischen Zeitalter vor 3-4 Milliarden Jahren extreme Umweltbedingungen vorherrschten, denen sich die Organismen anpassen mussten. Phänotypisch unterteilt man die Archaeabakterien in zwei Gruppen: Die sulfatreduzierenden Arten der Familie der *Crenarchaeota*, denen die Gattung *Sulfolobus* zuzuordnen ist und die *Euryarchaeota*, welche die Gruppen der Methanogenen und Halophilen umfasst. Neuerdings wird unter Mikrobiologen die Existenz einer dritten Gruppe mit dem vorläufigen Namen *Korarchaeota* diskutiert (Huber & Stetter, 1998, Burggraf *et al*., 1997).

Auch unter den höher entwickelten Eubakterien finden sich zahlreiche thermophile Organismen. Die bekanntesten aeroben Vertreter kommen aus der Gattung *Thermus*. So wurde aus *Thermus aquaticus* eine thermophile Protease isoliert, die breite technische Anwendung findet. Die aus dem gleichen Organismus gewonnene und in der PCR-Methode eingesetzte *taq*-Polymerase wurde bereits erwähnt (Brock, 1969).

1.2.5 Thermophile Streptomyceten

Die weit verbreitete Gattung *Streptomyces* unterteilt sich aufgrund ihrer bemerkenswerten taxonomischen Variationen in viele Spezies und Sub-Spezies. Zur Zeit sind über 500 Arten bekannt. Sie enthält damit die größte Zahl kultivierbarer Arten in der Klasse der Eubakterien. Streptomyceten sind aerobe, chemoorganothrope, Gram-positive Eubakterien mit einen hohen GC-Gehalt von 74 %. Bei der den *Actinomyceten* zugehörigen Gattung handelt es sich um typische Bodenbakterien, die mycelartig wachsen und sich vorwiegend in trockenen, neutralen oder alkalischen Böden finden. Charakteristisch ist der im Frühling aus umgebrochenen Böden entströmende muffige Geruch, der auf ein aus Streptomyceten isoliertes ätherisches Öl, das Geosmin, zurückzuführen ist.

Die ökologische Bedeutung der Streptomyceten liegt vor allem in der Kompostierung organische Abfälle. Für diese ökologischen Aufgabe stehen eine Reihe extrazelluläre hydrolytischer Enzyme wie Cellulasen, Hemicellulasen, Chitinase, sowie Amylasen, Lipasen und Proteasen zur Verfügung, die auch von biotechnologischem Interesse

sind, z.B. für umweltschonende Papierherstellung.

Von besonderer industrieller Bedeutung ist die Fähigkeit der Streptomyceten zur Bildung von Sekundäremetaboliten, die oft antibiotisch wirken (Kutzner 1986; Williams *et al*., 1989). Bisher wurden über 4000 verschiedene Antibiotika aus Streptomyceten isoliert. Einige davon finden Anwendung im medizinischen Bereich, wie Streptomycin, Chloromycetin und verschiedene Tetracycline.

Neben Antibiotika wurden aus Streptomyceten Enzyme aus allen sechs Enzymklassen isoliert und beschrieben (Peczynska-Czoch & Mordarski, 1988; Sanglier *et al.*,1993, Sidhu *et al.,* 1994). Zudem wurde eine Vielzahl weiterer Wirksubstanzen wie Cytotoxine, Immunosuppressiva, antivirale Stoffe, Fungizide, Herbizide aus Stämmen dieser Gattung gewonnen.

Streptomyceten haben gute Wachstumseigenschaften und erreichen hohe Zelldichten. Sie sind daher für die Industrie aufgrund einfacher Gewinnung großer Enzymmengen von besonderem Interesse. Auf einfachen Nährböden zeigen Streptomyceten ein filamentöses Wachstum mit einer Zelldifferenzierung, der Ausbildung von Luftmycel mit anschließender Sporulation. Trotz ihrer prokaryontischen zellulären Organisation besitzen die Streptomyceten Ähnlichkeiten mit höheren Organismen hinsichtlich der strukturellen Komplexität und der multizellulären Differenzierung (Bruton, 1995; Miquéles, 2000 ; Keleman, 2001).

Die meisten Stämme der Gattung *Streptomyces* wachsen bei moderaten Temperaturen und sind den mesophilen Bakterien zuzuordnen. Thermophile Vertreter dieser Gattung sind eher selten und wenig beschrieben (Kim *et al.,* 1999; Bruins, *et al*., 2001). Dennoch sind gerade diese aufgrund ihrer einfachen Kultivierungsbedingungen für technische Anwendungen interessant (Kutzner, 1986). Thermophile Streptomyceten-stämme, wie *S. thermonitrificans* und *S. thermoflavus,* sind eher im moderat thermophilen Bereich bis 55°C zu finden (Desai & Dhala, 1967; Williams *et al*., 1983), es gibt aber auch Stämme, deren Temperaturoptimum bei 65°C liegt, z. B. *S. thermophilus* und *S. thermofuscus* (Waksman & Lechevalier, 1939).

Noch heute ist die taxonomische Zuordnung thermophiler Streptomyceten nicht eindeutig geklärt. Während Corbaz *et al.* (1963) die Organismen nicht als thermophil,

sondern als thermotolerant beschrieben, schlugen Graveri & Pagani (1962) vor, thermophile Streptomyceten nicht als eine Unterklasse der Streptomyceten anzusehen, sondern diese einer eigenständigen Gattung *Thermostreptomyces* zuzuordnen. Entsprechend werden *Thermostreptomyceten* in der 8. Ausgabe von „Bergey's Handbuch für Bakterien" als eigenständige Klasse geführt (Pridham & Tresner, 1974).

Williams *et al*. (1983) untersuchten eingehend die thermophilen Streptomyceten in Hinblick auf ihre phänotypische Einteilung und ordnete die Stämme *S. thermoflavus*, *S. thermonitrificans* und *S. thermovulgaris* einem einzigen Cluster zu, während die als thermophil charakterisierten Stämme *S. thermodiastaticus*, *S. thermophilus*, *S. thermotolerant*, *S. thermoviolaceus* in die Peripherie einiger mesophiler Stämme anzusiedeln sind. Thermophile Streptomyceten können folglich phylogenetisch eindeutig von mesophilen Streptomyceten unterschieden werden (Goodfellow *et al*., 1987).

Die Spezies *S. thermovulgaris* (*thermovulgaris*, lat.: allgemein hitzeliebend) weist eine besondere Thermostabilität auf (Lehmacher & Bisswanger 1990; Inyang *et al.* 1995). So wurde aus dem bei etwa 50°C optimal wachsenden Stamm eine thermophile Xylose-Isomerase isoliert (Raykovska *et al*., 2001). Thermophile Proteasen haben großen Nutzen für biotechnologische und molekularbiologische Anwendungen (Zeikos *et al.*, 1998; Lasa & Berenguer, 1993). Der in dieser Arbeit verwendete Stamm wurde aus nigerianischen Bodenproben isoliert (Inyang *et al*., 1996). Abb. 6 zeigt eine Bakterienkolonie dieses Stammes nach Wachstum auf Agar/Malz Nährboden.

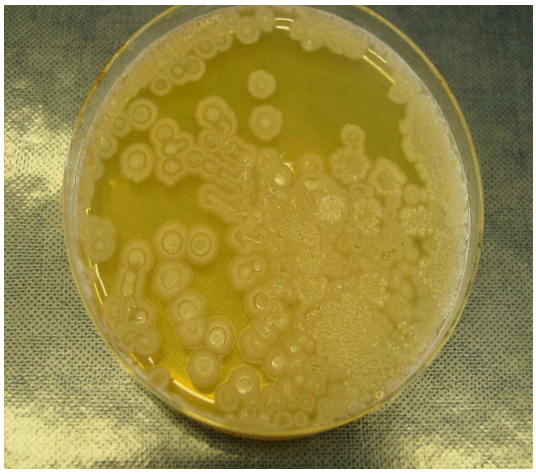

Abb. 6*:* Kolonien von *S. thermovulgaris* nach Wachstum auf Agar/Malz-Nährboden.

2 Problemstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Gewinnung von Proteasen, die sich für technische Anwendungen eignen. Diese Proteasen sollten folgende Voraussetzung erfüllen:

a) Guten Wachstumseigenschaften des Bakterienstammes
b) Hohe Enzymaktivitäten
c) Einfache Isolierung
d) Hohe Stabilität

Insbesondere die beiden letztgenannten Punkten sollten an besten durch extrazelluläre Proteasen erfüllt sein. Da Exoenzyme nicht mehr durch das Zellmilieu geschützt werden und somit extremeren Umwelteinflüssen ausgesetzt sind, lassen sie eine gesteigerte Stabilität erwarten. Eine weitere Zunahme der Stabilität sollte durch Verwendung eines thermophilen Organismus erreicht werden.

In dieser Arbeit wurden Proteasen aus zwei aus nigerianischen Bodenproben isolierten Bakterienestämmen untersucht. Der Stamm *Paenibacillus sp.* dient als Beispiel eines einfach zu kultivierenden mesophilen Organismus. *S. thermovulgaris*, der während der Anzucht eine hohe Zelldichte aufweist, ist ein thermophiler Vertreter der Streptomyceten. Aus beiden Stämmen wurden bereits erfolgreich Exoenzyme isoliert.

Die Exoenyzme sollen durch ein einfaches und effektives Reinigungsverfahren aus dem zellfreien Medium in homogener Form zu gewinnen sein. Zum Proteasenachweis während des Isolierungsverfahrens diente zunächst eine unspezifische Testmethode. Mit Hilfe spezifischer Substrate und Hemmstoffe sollte anschließend der Proteasetyp ermittelt werden und weitere Untersuchungen sollten Angaben über Größe und kinetische Eigenschaften ergeben. Zusätzlich sollte die Stabilität der isolierten Proteasen gegenüber äußeren Einflüssen wie Temperatur und pH untersucht werden. Schließlich soll die Stabilisierung mittels Immobilisierung und damit deren technische Anwendbarkeit überprüft werden.

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung einer thermophilen extrazellulären Protease aus *S. thermovulgaris*

3.1.1 Reinheitsüberprüfung des Bakterienstamm

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Gewinnung möglichst stabiler und thermoresistenter Proteaseaktivitäten. Dazu wurden einerseits Bakterienstämme untersucht, die aus unwirtlichen Umgebungen stammten. Andererseits wurde ein besonderes Augenmerk auf extrazelluläre Enzyme gelegt, da diese im allgemeinen einfacher zu gewinnen sind als intrazelluläre. Es kann dabei auf mögliche schädigende Zellextraktionen verzichtet werden und das betreffende Enzym muss nicht aus einer Vielzahl unterschiedlichster Zellbestandteile isoliert werden. Besonders aber ist zu erwarten, dass extrazelluläre Enzyme resistenter gegenüber Umwelteinflüsse sind (Cooper, 1981; Thangam, 2002).

Der aus nigerianischen Bodenproben isolierte Bakterienstamm *S. thermovulgaris* eignet sich aufgrund seiner guten Wachstumseigenschaft und der Sekretion extrazellulärer Enzyme besonders zur Untersuchung von Protease-Aktivitäten. Zunächst musste die Reinheit des Bakterienstamms überprüft werden. Dazu wurden Malz-Agar Platten gegossen und anschließend mit einer Stammkultur beimpft. Nach einer Inkubationszeit von 2 bis 3 Tagen bei 50°C waren die Platten mit einheitlichen Kolonien bewachsen, was die Reinheit des Stammes bezeugt. Abb. 7 zeigt eine einzelne Kolonie in 40facher Vergrößerung.

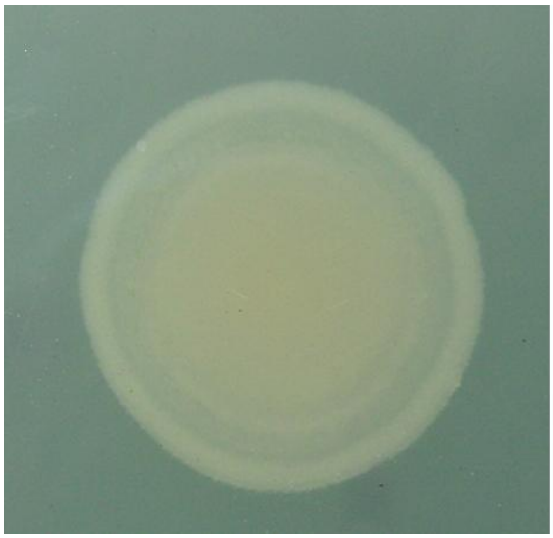

Abb. 7: 40fache Vergrößerung einer Einzelkolonie von *S. thermovulgaris* nach Wachstum auf einer Malz/Agar-Platte.

3.1.2 Stammhaltung von *S. thermovulgaris*

Für die Gewinnung der Dauerkulturen wurde wie in Kapitel 6.2.1 beschrieben, vorgegangen. Nach drei Tagen des Wachstums der Zellen von *S. thermovulgaris* bei 50°C wurde der in sterilen Gefäßen abzentrifugierte Niederschlag in wenig Medium aufgelöst. 200 µl der Zellsuspension wurde in sterilen Reaktionsgefäßen mit 20 % Glycerin überschichtet und bei –80°C aufbewahrt.

3.1.3 Optimierung der Kultivierungsbedingung

Für die Anzucht von *S. thermovulgaris* wurde ein Medium bestehend aus Hefeextrakt, Nutrient Broth und Glucose benutzt (s. Abschn. **6.2.1**). In drei Schritten, einer Vorkulturen und zwei Zwischenkulturen, wurden die Zellen hochgezogen und schließlich in einem Fermenter inkubiert. Für die erste Vorkultur wurden 5 Schikanekolben mit einer Füllmenge von 100 ml mit je 20 ml Medium versetzt und anschließend mit 200 µl Stammbakterien angeimpft. Die Kulturzeit für diese, wie auch für die Zwischenkulturen betrug 12 h. Die Inkubation der Kulturen erfolgte in einem Wasserbad-Rundschüttler bei 180 U/min und einer Temperatur von 50°C.

Für die erste Zwischenkultur wurden vier 500 ml Schikanekolben mit je 100 ml

Medium versetzt und jeder mit 10 ml der hochgewachsenen Vorkultur angeimpft. Die zweite Zwischenkultur bestand aus 4 x 250 ml Medium in 2 l Schikanekolben, die mit je 10 ml der vorausgegangenen Zwischenkultur beimpft wurden. Die zweite Zwischen-kultur diente der Beimpfung von 20 l Medium der anschließenden Fermentation.

Das Wachstum der Zellen wurde durch Trübungsmessung bei 546 nm verfolgt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Trübung nahm über einen Zeitraum von etwa zwei Tagen zu und blieb dann konstant. In einem parallelen Ansatz wurde im Kulturmedium Proteaseaktivät mit dem Azocaseintest gemessen. Dieser Test verwendet ein natürliches mit einem Chromophor modifiziertes Protein als Substrat und erfasst damit alle natürliche Proteine spaltenden Proteasetypen. Wie in Tabelle 1 zu erkennen, war bereits nach einem Tag im Kulturmedium eine deutliche Aktivität nachweisbar, die innerhalb 24 h weiter anstieg und selbst nach Wachstum über 4 Tage war noch ein weiterer geringfügiger Anstieg zu beobachten. In der Abschätzung des Zellwachstums, der Proteaseaktivität und möglicher Sterilitätsprobleme bei sehr langer Fermentation wurde ein Zeitraum von 96 h als optimal hinsichtlich der Proteaseproduktion angesehen und die weiteren Fermentationen zur Gewinnung der Proteaseaktivität über diesen Zeitraum durchgeführt.

Tabelle 1: Zellwachstums von *S. thermovulgaris* in Vollmedium in einem 20 l Fermenter bei 50°C. Die Zelldichte wurde durch Trübungsmessung bei 546 nm bestimmt. Parallel dazu wurde im Kulturmedium Proteaseaktivität mit dem Azocaseintest bei 350 nm gemessen**.**

Inkubationszeit [h]	Trübungsmessung [546 nm]	Aktivitätsmessung [350 nm]
12	0,843	0,345
24	1,438	0,840
48	1,568	0,837
72	1,623	0,867
96	1,687	0,977

Ein weiteres Problem ergab sich hinsichtlich des pH-Werts. Im Laufe der Fermentation fiel der pH-Wert kontinuierlich bis auf pH 3 ab, wodurch sich das Zellwachstum von selbst einstellte. Daher wurden die Fermentationen pH-statisch gefahren und der pH-Wert über einen Regelkreislauf bei 7.2 konstant gehalten.

Die Zellmasse einer Fermentation betrug durchschnittlich 45 g. Die Zellen wurden mit einer Durchlaufzentrifuge abgetrennt und nicht weiter verarbeitet. Der Überstand wurde in Portionen zu 2 l aufgeteilt und bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

3.1.4 Konzentrierung des Kulturüberstand

Das große Volumen des Kulturüberstandes erforderte zunächst einen Konzentrierungsschritt. Hierfür wurde der Überstand bis zu einer Sättigung von 80% mit festem Ammoniumsulfat versetzt, für eine Präparation mit 2 l wurden 1122 g benötigt (Holtzhauer, 1988). Die Zugabe des Salzes erfolgte langsam bei 4°C unter ständigem Rühren über Nacht. Der ausgefallene Niederschlag wurde abzentrifugiert und die überstehende Lösung verworfen. Zwei l Kulturüberstand ergaben 16 g Niederschlag, dieser wurde in 20 ml 0,05 M Tris-HCl pH 7,5 gelöst.

Zur Entfernung des Ammoniumsulfats wurde die Lösung gegen 1 l 0,05 M Tris-HCl pH 7,5 dialysiert. Der Puffer wurde in Zeitabständen von etwa 2 Stunden insgesamt viermal gewechselt. Das Dialysat hatte ein Endvolumen von 50 ml.

3.1.5 Ionenaustauschchromatographie

Als erster Reinigungsschritt der Protease aus *S. thermovulgaris* wurde eine Ionenaustauschchromatographie herangezogen, die eine große Kapazität bei guter Auftrennung hat und sich daher für größere Proteinmengen und wenig vorgereinigte Fraktionen besonders eignet. Ein Vorversuch mit dem Anionenaustauscher DEAE-Cellulose ergab jedoch nur eine schwache Bindung der Proteaseaktivität an das Material und daher keinen besonderen Reinigungseffekt.

Es wurde deshalb ein Kationenaustauscher mit Cellulose als Matrix und

Carboxymethyl-Resten als funktionelle Gruppen (CM-Cellulose) verwendet. Eine Säule der Länge: 20 cm und einem Durchmesser von 2 cm wurde mit diesem Material gefüllt und mit 0,05M Tris-HCl pH 7,5 äquilibriert. Dann wurden 20 ml des Dialysats des mit Ammoniumsulfat konzentrierten Kulturüberstandes von *S. thermovulgaris* auf die Säule aufgetragen. Die Elution der Protease erfolgte mit Hilfe eines aufsteigenden Gradienten von 0 bis 0,5 M NaCl in 0,05M Tris-HCl pH 7,5 mit einem Gesamtvolumen von 300 ml. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min.

Insgesamt wurden 100 Fraktionen von je 3 min gesammelt. Jede zweite Fraktion wurde getestet. Die Ergebnisse der UV-Absorption sowie der Messungen der proteolytischen Aktivität mittels Azocasein sind in Abb. 8 wiedergegeben. Es sind zwei Maxima für die Absorption bei 280 nm zu erkennen, das erste größere Maximum bei den Fraktionen 12-19 und ein weiteres wesentlich kleineres Maximum bei den Fraktionen 30-34.

Auch die Bestimmung der Proteaseaktivität mit dem Azocaseintest zeigte zwei Absorptionsmaxima, das erste zwischen den Fraktionen 12-23 und das zweite zwischen den Fraktionen 27-35 (s. Abb. 8). Damit fallen Protein- und Aktivitätsmaxima weitgehend zusammen. Die beiden Aktivitätsmaxima sind offensichtlich auf zwei unterschiedliche proteolytische Aktivitäten zurückzuführen. Allerdings sind die Intensitätsverhältnisse deutlich verschieden. Während die beiden Aktivitätsmaxima vergleichbar sind, ist das erste Absorptionsmaximum bei 280 nm wesentlich größer als das zweite. Entsprechend ist die spezifische Proteaseaktivität im zweiten Maximum deutlich höher als im ersten, was den Ausschlag gab, diese Aktivität weiter zu verfolgen, auch wenn deren Gesamtaktivität etwas geringer war. Die aktiven Fraktionen des zweiten Maximums wurden vereinigt, konzentriert und die Enzymaktivität sowie der Proteingehalt nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt

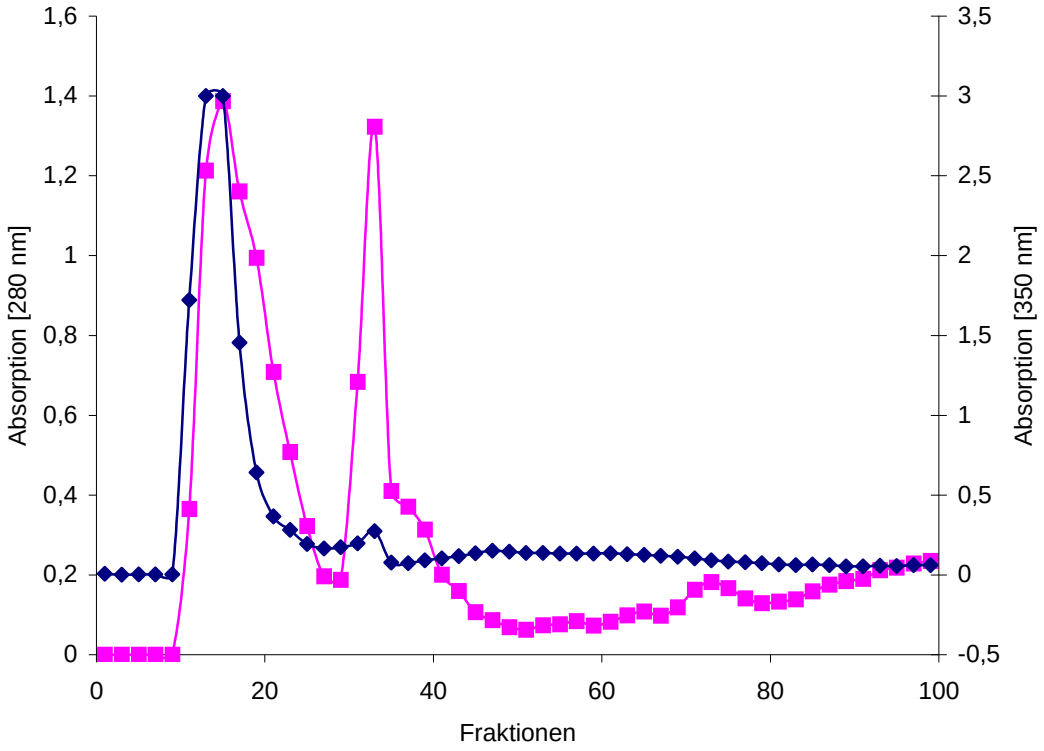

Abb. 8: Elutionsprofil des dialysierten Ammoniumsulfat-Niederschlags von *S. thermovulgaris* nach Chromatographie an CM-Cellulose. Es wurden 20 ml des dialysierten Ammoniumsulfatpräzipitats mit einem Proteingehalt von 76 mg aufgetragen und mit einem Gradienten von 0 - 0,5 M NaCl in 0,05 M Tris-HCl pH 7,5 eluiert. Bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min wurden Fraktionen zu je 3 ml gesammelt. (♦) Absorption bei 280 nm, (■) Enzymaktivität, bestimmt mit dem Azocaseintest bei 350 nm.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse der Reinigungsschritte der extrazellulären Protease aus *S. thermovulgaris.*

Reinigunsschritte	Kulturfiltrat nach Ammonium-sulfatfällung	Eluat der CM-Cellulose-Chromatographie
Volumen [ml]	50	9
Gesamtprotein [mg]	191,74	4,95
Proteinkonzentration [mg/ml]	3,83	0,55
Gesamtaktivität [U]	82,2	10,8
Spezifische Aktivität [mU/mg]	428,7	2181
Anreicherung	1	5
Ausbeute [%]	100	33

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Reinigung der thermophilen Protease aus *S. thermovulgaris* nach Ammoniumsulfatpräzipitation und CM-Cellulose zusammengefasst. Durch den Kationenaustauscher erhöhte sich die spezifische Aktivität um das Fünffache. Die Ausbeute betrug 33 %, wobei dieser Aktivitätsverlust hauptsächlich auf die Abtrennung der zuerst eluierten Proteasebande nach CM-Cellulose-Chromatographie zurückzuführen ist.

3.1.6 Reinheitsbestimmung der isolierten Protease aus *S. thermovulgaris*

3.1.6.1 SDS-PAGE

Zur Reinheitskontrolle der isolierten Protease wurde das zweite Elutionsmaximum der CM-Cellulose-Säule sowie das Ammoniumsulfatpräzipitat des Kulturüberstandes einer SDS-PAGE nach Laemmli (1970) unterworfen. Das Gel war 10%ige bezüglich

Acrylamid. Als Größenstandards diente eine Proteinleiter von 20-150 kDa (Abb. 9). Während in der Probe nach der Ammoniumsulfatpräzipitation noch eine große Anzahl von Proteinbanden zu erkennen ist (linkes Gel, mittlere Spur), zeigt sich im Eluat des Kationenaustauschers sowohl nach Anfärbung mit Silberfärbung (linkes Gel, rechte Spur) wie mit Coomassie Brillantblau (rechtes Gel, rechte Spur) nur noch eine homogene Bande. Die beiden Reinigungsschritte der Ammoniumsulfatfällung und CM-Cellulose-Chromatographie waren demnach ausreichend, ein reines Enzympräparat zu erhalten.

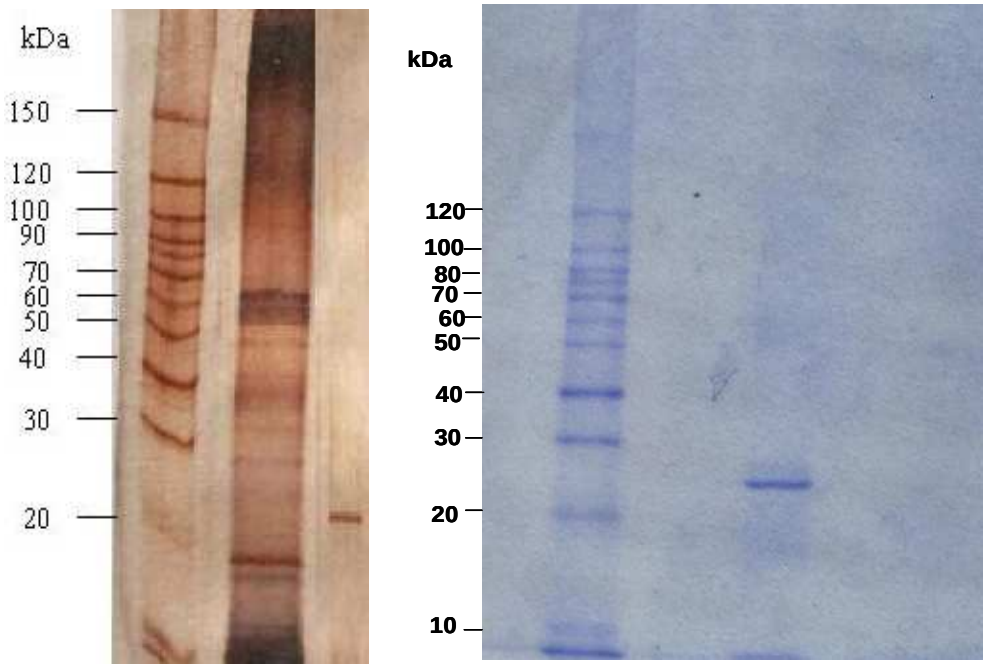

Abb. 9: SDS-PAGE des Eluats der CM-Cellulose.
Linkes Gel:
linke Spur: Standardproteine (molekulare Massen sind links angegeben);
mittlere Spur: Kulturfiltrat nach Ammoniumsulfatfällung (18,4 µg);
rechte Spur: gereinigte Enzymfraktion nach CM-Cellulose-Chromatographie (0,5 µg). Die Anfärbung erfolgte mit Silbernitrat.
Rechtes Gel,
linke Spur: Standardproteine mit Angabe der molekularen Massen;
rechte Spur: Enzymfraktion (9 µg) nach CM-Cellulose. Die Anfärbung erfolgte mit Coomassie Brillant-blau.

Aus der elektrophoretischen Wanderungsstrecke der Standardproteine auf der SDS-PAGE lässt sich die molekulare Masse der isolierten Protease aus *S. themovulgaris* bestimmen. In Abb. 10 sind die Wanderungsstrecken der Standardproteine aus dem in Abb. 9 dargestellten Versuch (rechtes Gel) gegen den Logarithmus ihrer molekularen Massen aufgetragen. Die Zuordnung der molekularen Masse der Standardproteine erfolgte nach Herstellerangaben. Über die halblogarithmische Auftragung konnte für die isolierte Protease aus *S. thermovulgaris* mit einer Wanderungstrecke von 4,7 cm eine molekulare Masse von 24 kDa ermittelt werden.

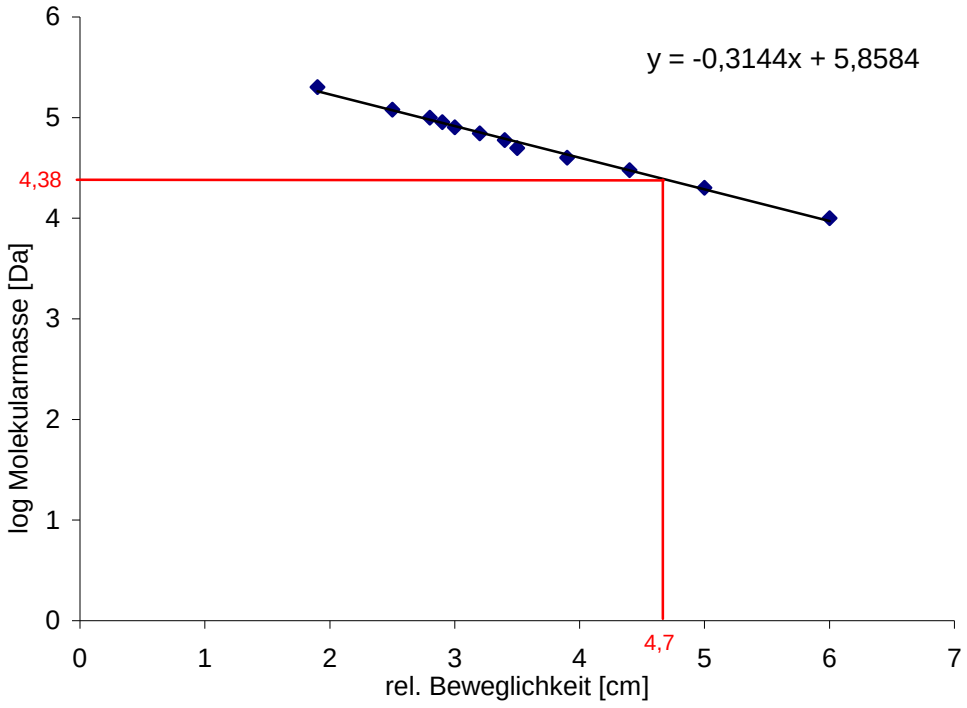

Abb. 10: Bestimmung der molekularen Masse der isolierten Protease aus *S. thermovulgaris.* Die molekularen Massen der Standardproteine wurden halblogarithmisch in Abhängigkeit ihrer relativen Beweglichkeit im 10%igen Polyacrylamidgel auftragen. Die Daten sind dem rechten Gel aus Abb. 9 entnommen. Die vertikale Linie gibt die Position der Wanderungsstrecke der Protease, die horizontale Linie die daraus resultierende Molekülmasse an.

3.1.6.2 Native Gelelektrophorese

Die homogene Bande der isolierten Protease aus *S. thermovulgaris* in der SDS-Elektrophorese spricht für eine reines Präparat, bestehend aus einer Proteinspezies. Allerdings kann Aggregation zu mehreren Untereinheiten nicht ausgeschlossen werden, wie auch nicht die Möglichkeit einer Verunreinigung an der gleichen Position in der Elektrophorese. Daher wurde als weiteres Reinheitskriterium die diskontinuierliche Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen gewählt, bei der das Protein neben der Größe vor allem nach seiner Ladung wandert.

Die Zusammensetzung des Gels bei der nativen Gelelektrophorese war identisch mit den Gelen für die diskontinuierliche SDS-Elektrophorese, nur wurde SDS weggelassen. Dadurch bleibt die native Konformation der Proteine erhalten. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel entnommen und die Proteinbanden mit Hilfe der Silberfärbung sichtbar gemacht.

Abb. 11: Elektropherogramm einer nativen Gelelektrophorese der isolierten Protease aus *S. thermovulgaris* mit anschließender Silberfärbung nach Kationenaustausch-Chromatographie. Auftragsmengen: links 5 µl (Proteingehalt: 0,14 µg); rechts 10 µl (Proteingehalt: 0,36µg).

Abb. 11 lässt deutlich auch hier nur eine Bande erkennen. Somit lag das Enzym nach der Reinigung mittels Kationenaustauscher-Chromatographie in reiner Form vor.

3.1.6.3 Zymographie

Auch wenn die homogene Bande in der nativen Elektrophorese mit großer Wahrscheinlichkeit der isolierten Protease aus *S. thermovulgaris* zuzuordnen ist, sollte diese Aussage durch einen direkten Aktivitätsnachweis bekräftigt werden. Bei dieser Technik wird die Proteaseaktivität des getrennten Proteins direkt nach der elektrophoretischen Auftrennung detektiert. Die Proteine werden hierbei unter denaturierenden, nicht aber reduzierenden Bedingungen getrennt. Hierbei wurde eine 0,1%ige Gelatine-Lösung als Substrat zusammen mit dem SDS-Gel copolymerisiert (s. Abschn. 6.2.6.4). Auf das Gel wurden 30 µl des Eluats der CM-Cellulose mit einem Proteingehalt (45 µg) aus *S. thermovulgaris* aufgetragen. Das Proteins wurde in einem 2,5%-igen Sammelgel bei pH 6,8 gesammelt, die Trennung erfolgte in einem 10%igen Trenngel im alkalischen Bereich bei pH 8,8 bei einer Stromstärke von 28 mA. Nach Ende der Elektrophorese wurde das Gel aus der Kammer entnommen und zur Entfernung von SDS aus dem Gel mit einer 2,5%-igen Lösung von Triton-X-100 für eine Stunde inkubiert. Der anschließende proteolytische Gelatineabbau erfolgte in 0,05 Tris-HCl pH 7,5 bei 50°C bei ständigem Schütteln über Nacht. Danach wurde das Gels mit Coomassie Brillantblau angefärbt. Durch die im Gel gleichmäßig verteilte Gelatine nahm das Gel eine homogene Blaufärbung an, die nur an der Stelle des Gelatineabbaus ausbleichte (Abb. 12).

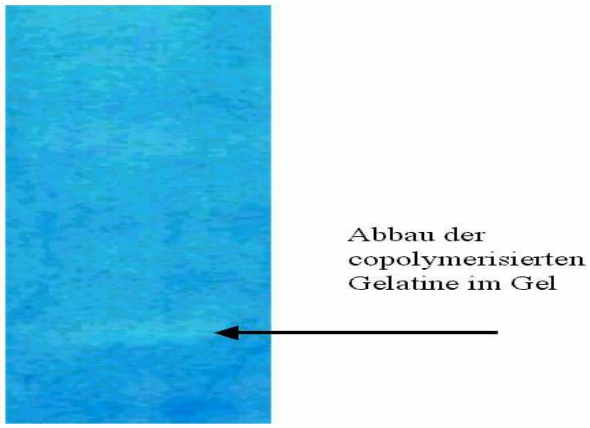

Abb. 12: Aktivitätsanfärbung der gereinigten Protease aus *S. thermovulgaris* nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem mit 0,1%-ige Gelatine co-polymerisiertem 10%igen Polyacrylamidgel. Die Gelfärbung erfolgte mit Coomassie Brillantblau.

3.1.7 Bestimmung der molekularen Masse durch Gelfiltration

In der SDS-PAGE wurde für die isolierte Protease aus *S. thermovulgaris* eine homogene Bande gefunden, die entsprechend einer molekulare Masse von 24 kDa wanderte. Doch kann weder aus dieser Methode noch aus der nativen Gelelektrophorese unterschieden werden, ob das Enzym natürlicherweise als Monomer dieser Größe vorliegt oder aus mehreren Untereinheiten aufgebaut ist. Die Bestimmung der molekularen Masse über die Gelfiltrationschromatographie sollte diese Frage klären.

Eine Säule der Maße (74 cm; Ø 2 cm) wurde mit Sephacryl S-200 gefüllt und mit 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5 äquilibriert. Zur Eichung der Säule wurden verschiedene Substanzen unterschiedlicher Größe aufgetragen. Dextranblau aus *Leuconostoc ssp*. mit einer Molmasse von 2000 kDa liegt über dem Trennbereich der Säule und diente in einem ersten Lauf der Bestimmung des Ausschlussvolumens. Die Elution wurde bei einer Absorption von 580 nm verfolgt und somit Volumen von 117 ml bestimmt. Katalase aus Rinderleber (240 kDa), Lactat-Dehydrogenase (LDH) aus Schweineherz (140 kDa) und BSA (67 kDa) dienten als Größenstandards. Das Volumen vom Auftragen der Standards auf die Säule bis zum Austreten der Elutionsmaxima wird als Elutionsvolumen definiert. Aus den Verhältnis des Elutionsvolumen zum Ausschlussvolumen ergibt sich der Grad der Retardierung der Proben.

Die unbekannte Protease wurde zusammen mit den Standardproteine auf die mit 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5 äquilibrierte Säule aufgetragen und mit einer Elutions-geschwindigkeit von etwa 0,8 ml/min mit dem gleichen Puffer eluiert. Es wurden Fraktionen von je 2,4 ml gesammelt. Die Enzymaktivität der Protease wurde mit dem Azocasein-Test bei 350 nm gemessen. Die spektroskopisch detektierte zeitliche Abnahme der Absorption bei 240 nm infolge der Reduktion von H_2O_2 zu H_2O war ein Maß der Katalaseaktivität. Die LDH-Reaktion wurde über die Reduktion von Pyruvat zu Lactat anhand der Abnahme der Absorption von NADH bei 340 nm verfolgt. BSA wurde durch UV-Absorption bei 280 nm detektiert. In Abb. 13 sind die Messwerte in einem Elutionsprofil gegen die Fraktionsnummern aufgetragen.

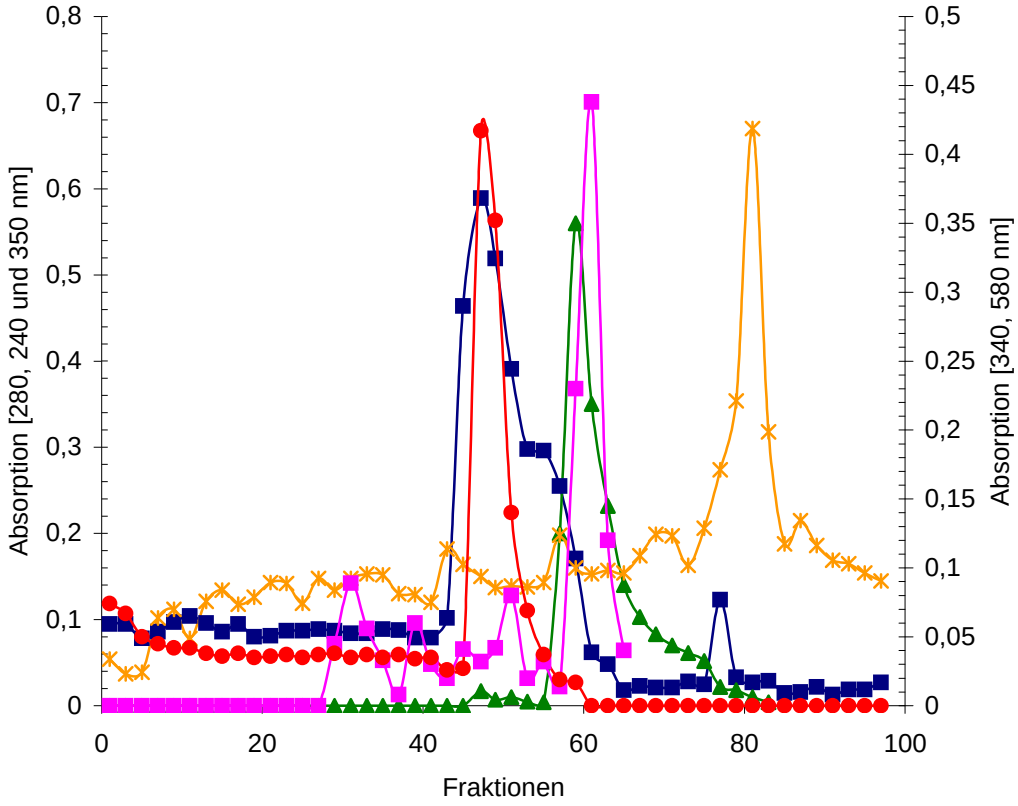

Abb. 13: Größenbestimmung der Protease aus *S. thermovulgaris* an Sephacryl S-200 mit den Standardsubstanzen bekannter Masse. Folgende Mengen wurden aufgetragen: Katalase 0,1 mg; BSA 1mg; LDH, 1mg; Protease aus *S. thermovulgaris*, 1,65 mg. Die Elution der Substanzen erfolgte mit 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5. Es wurden Fraktionen mit jeweils 2,4 ml gesammelt und spektroskopisch detektiert.
Die linke Absorptionsskala zeigt die Bestimmung von Katalase bei 240 nm über die Reduktion von H_2O_2 zu H_2O (▲), von BSA bei 280 nm (■) und der Protease aus *S. thermovulgaris* bei 350 nm (✳). Die rechte Absorptionsskala zeigt die LDH-Bestimmung bei 340 nm (◆) über Reduktion von Pyruvat zu Lactat und die Absorption von Dextranblau bei 580 nm (●).

Aus Abb. 13 wurden die Elutionsvolumina der Eichproteine Katalase, LDH und BSA ermittelt und zusammen mit dem Elutionsvolumen der Protease aus *S. thermovulgaris* in Tabelle 3 wiedergegeben.

Tabelle 3: Molmassen und Elutionsvolumina der Eichproteine und der Protease aus *S. thermovulgaris* für die Gelfiltration auf Sephacryl S-200.

Substanzen	Molekulare Masse [Da]	Elutionsvolumen [ml]
Katalase	240000	149
LDH	140000	155
BSA	67000	190
Protease aus *S. thermovulgaris*	28800	213

In Abb. 14 sind die ermittelten Elutionsvolumina der Eichproteine gegen den Logarithmus der molekularen Massen aufgetragen. Aus der linearen Regression wurde die Masse des isolierten Enzyms zu 28,8 kDa bestimmt. Der Wert ist zwar etwas höher als der bei der SDS-PAGE bestimmte Wert von 24 kDa, doch kann aufgrund der homogenen Bande bei der SDS-PAGE und dem Resultat der Gelfiltration geschlossen werden, dass die isolierte Protease aus *S. thermovulgaris* natürlicherweise in monomerer Form vorliegt.

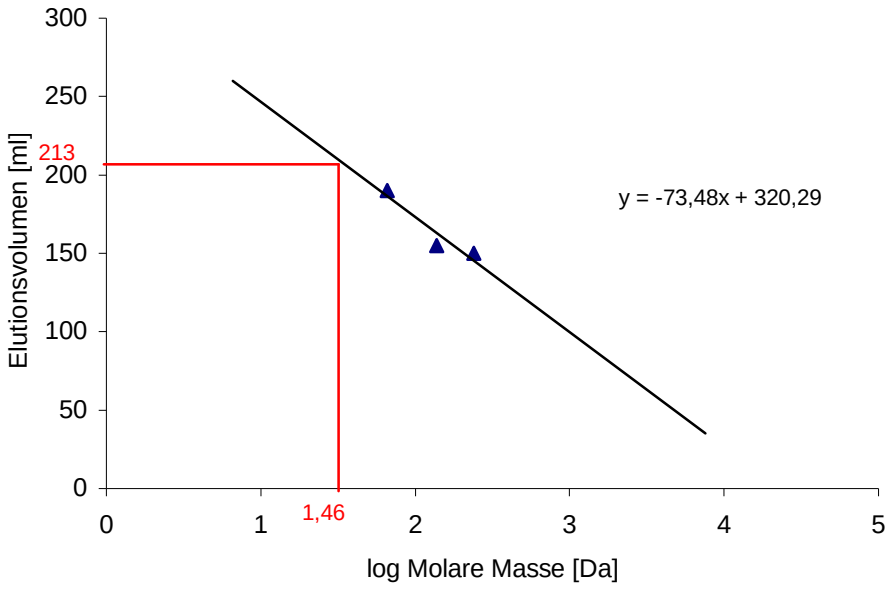

Abb. 14: Elutionsvolumina der Eichproteine Katalase, LDH und BSA in Abhängigkeit vom Logarithmus ihrer molekularen Masse. Die Linien zeigen das Elutions-volumen und die sich daraus ergebende Molmasse für die Protease aus *S. thermovulgaris*.

3.2 Reinigung einer extrazellulären Protease aus *Paenibacillus sp.*

3.2.1 Zellkultivierung von *Paenibacillus sp.*

Der aus nigerianischen Bodenproben isolierte Bakterienstamm *Paenibacillus sp.* wurde ebenfalls auf Segregation extrazellulärer Proteasen untersucht. Zur Herstellung von Stammkulturen wurde wie in Abschn. 6.2.4 beschrieben vorgegangen. Nach zwei Tagen Wachstum in 150 ml Vollmedium aus Nutrient Broth bei 30°C wurden die Zellen in sterilen Gefäßen abzentrifugiert. Die abgetrennten Zellen wurden anschließend in 5 ml Vollmedium suspendiert und in 200 µl Portionen über eine sterile 20%-igen Glycerinlösung geschichtet. Die Stammkulturen wurden bei –80°C aufbewahrt.

Zur Kultivierung der Bakterienzellen wurde in einem ersten Schritt eine Vorkultur bestehend aus 50 ml Vollmedium in einem Schikanekolben mit 0.2 ml der Stammkultur angeimpft. Die Kultivierung erfolgte in einem thermostatisierbaren Inkubator bei 120 U/min und 30°C für 24 h. In einen zweiten Schritt wurde das Hauptkulturmedium, bestehend aus gelöstem Trypton, Hefeextrakt, Magnesiumsulfat und Gelatine in 1 l H_20, mit der Vorkultur angeimpft und für 48 h bei 30°C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen in einer Durchlaufzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand mit einem Volumen von 800 ml wurde für die weitere Aufarbeitung verwendet beziehungsweise eingefroren, die Zellen wurden verworfen.

3.2.2 Ammoniumsulfatfällung und Dialyse

Für die Anreicherung der Protease aus *Paenibacillus. sp* wurden zu 800 ml des Kulturüberstands 448 g fein zermörsertes Ammoniumsulfat über einen Zeitraum von 1 h zugegeben, um eine 80%ige Endkonzentration zu erzielen (Holtzhauer, 1988). Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und in 20 ml 0,05 M Kaliumphosphat pH 7,5 gelöst. Zur Entfernung von Ammoniumsulfat wurde die Lösung in einem Dialyseschlauch gefüllt und über 12 h gegen 1 l 0,05 M Kaliumphosphat pH 7,5 dialysiert, wobei der Puffer in Abständen von jeweils 3 h viermal gewechselt wurde. Es resultierten 30 ml Proteinlösung, die mittels einer Ultrafiltrationsmembran mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa in einer Rührzelle auf 10 ml eingeengt wurde.

3.2.3 Gelfiltrationschromatographie an Sephacryl S-200

Für die Reinigung der Protease aus *Paenibacillus sp.* wurde die konzentrierte Proteinlösung des Ammoniumsulfatpräzipitats auf eine Sephacryl S-200 Gelfiltrationsäule aufgetragen. Bei einem Fluss von 1 ml/min wurden Fraktionen zu 3 ml gesammelt.

Zur Abschätzung der Proteinverteilung wurde die Absorption bei 280 nm verfolgt, mittels des Azocaseintests wurde bei 350 nm die Proteaseaktivität gemessen.

In Abb. 15 ist das Elutionsprofil des Gelfiltrationslaufs dargestellt. Im Eluat fanden sich zwei Absorptionsmaxima bei 280 nm, das erste bei den Fraktionen 23-29, das zweite bei den Fraktionen 41-57. Beide Maxima zeigten keine Proteaseaktivität. Vielmehr konnte mit dem Azocaseintest Enzymaktivität zwischen den beiden UV-Absorptionsmaxima bei den Fraktionen 39-42 gefunden werden, die folglich wenig Protein enthielten. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und mit Hilfe der Ultrafiltration an einer 10 kDa-Membran auf 4 ml eingeengt.

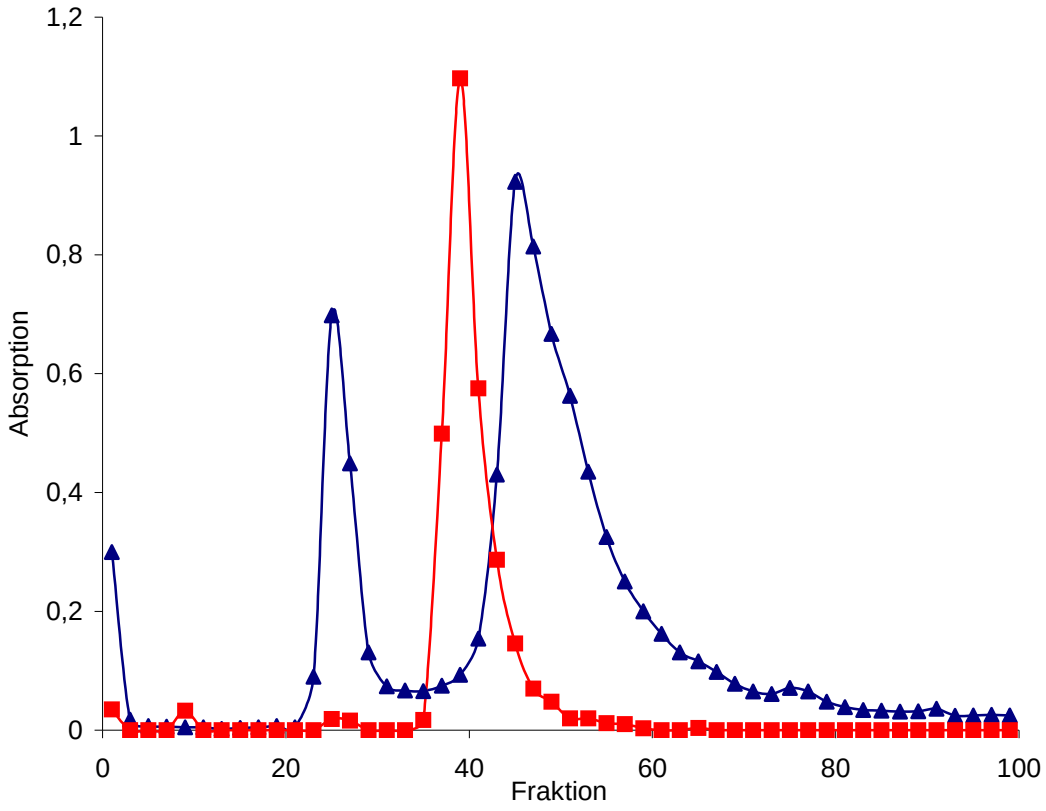

Abb. 15: Chromatographie des dialysierten Ammoniumsulfatpräzipitats von *Paenibacillus sp*. auf einer Sephacryl S-200-Säule. Die Säule hatte eine Länge von 90 cm und einen Durchmesser 2 cm. Sie wurde zuvor mit (0,05M Kaliumphosphat pH 7,5) äquilibiriert. Es wurden 13,2 mg der Probe in 6 ml aufgetragen und mit dem gleichen Puffer eluiert. Bei einer Lauf-geschwindigkeit von 1 ml/ min wurden Fraktionen zu 3 ml gesammelt.
(▲), Absorption bei 280 nm; (■), Azocaseintest bei 350 nm.

In Tabelle 4 sind die Messwerte der Aktivitätsmessung und der Proteinbestimmung der Protease aus *Paenibacillus sp*. nach Ammoniumsulfatpräzipitation sowie nach Gelfiltration zusammengefasst. Während des Reinigungsverlaufs der Protease aus *Paenibacillus sp.* wurde der Proteingehalt stark reduziert. Am Ende der gesamten Reinigung ist das Enzym aus *Paenibacillus sp.* bei einer Ausbeute von 65 % und um das 1,7-fache angereichert.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Messwerte der Ammoniumsulfatpräzipitation und der Gelfiltration der extrazellulären Protease aus *Paenibacillus sp.* Der Proteingehalt wurde nach der Methode von Bradford (1976) und die Enzymaktivität mittels des Azocaseintests bei 350 nm bestimmt. Das Eluat der Gelfiltrationssäule wurde nach Einengung bestimmt.

Reinigunsschritte	**Kulturfiltrat nach Ammoniumsulfatfällung**	**Eluat der Sephacryl S200**
Volumen [ml]	52	4
Gesamtprotein [mg]	114,4	5,2
Proteinkonz. [mg/ml)	2,2	1,3
Gesamtaktivität [U]	64,01	4,804
Spezifische Aktivität [mU/mg]	559,52	923,84
Anreicherung	1	1,7
Ausbeute [%]	100	65

3.2.4 Reinheits- und Größenbestimmung der Protease aus *Paenibacillus sp*.

3.2.4.1 SDS-PAGE

Zur Überprüfung der Reinheit wurde die isolierte Protease aus *Paenibacillus sp.* der SDS-PAGE in einem 10%igen Acrylamidgel unterworfen. Abb. 16 zeigt neben den Standardproteinen in Spur (A) der dialysierte Ammoniumsulfatniederschlag in Spur (B). Ganz rechts (C) ist das konzentrierte Eluat der Gelfiltration aufgetragen.. Während im Ammoniumsulfatpräzipitat noch mehrere Proteinbanden zu sehen sind, ergab das Eluat der Gelfiltrationschromatographie eine homogene Bande.

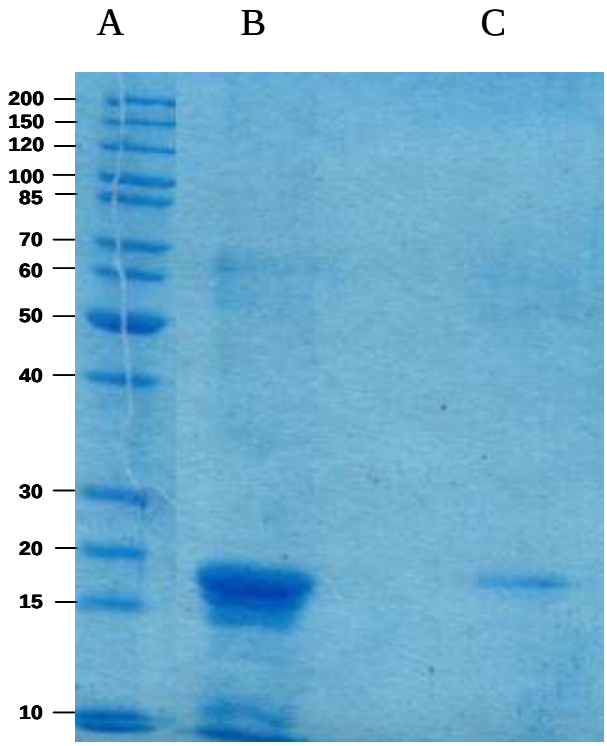

Abb. 16: SDS-PAGE der gereinigten Protease aus *Paenibacillus sp.*
A) Proteinstandard (10kDa-Leiter, die molekulare Massen sind am linken Rand angegeben); B) aufgelöstes, dialysiertes Ammoniumsulfatpräzipitat (Auftragsmenge 10,6 µg); C) Eluat nach Gelfiltration (0,64 µg). Die Proteine auf dem SDS-PAGE wurden mit Coomassie Brillantblau angefärbt.

Die relativen molekularen Massen der Standardproteine wurden halblogarithmisch gegen die Wanderungsstrecke aufgetragen (Abb. 16) Die Wanderungsstrecke der Protease aus *Paenibacillus sp*. lag bei 3,8 cm. Daraus resultiert eine molekulare Masse von 17,4 kDa.

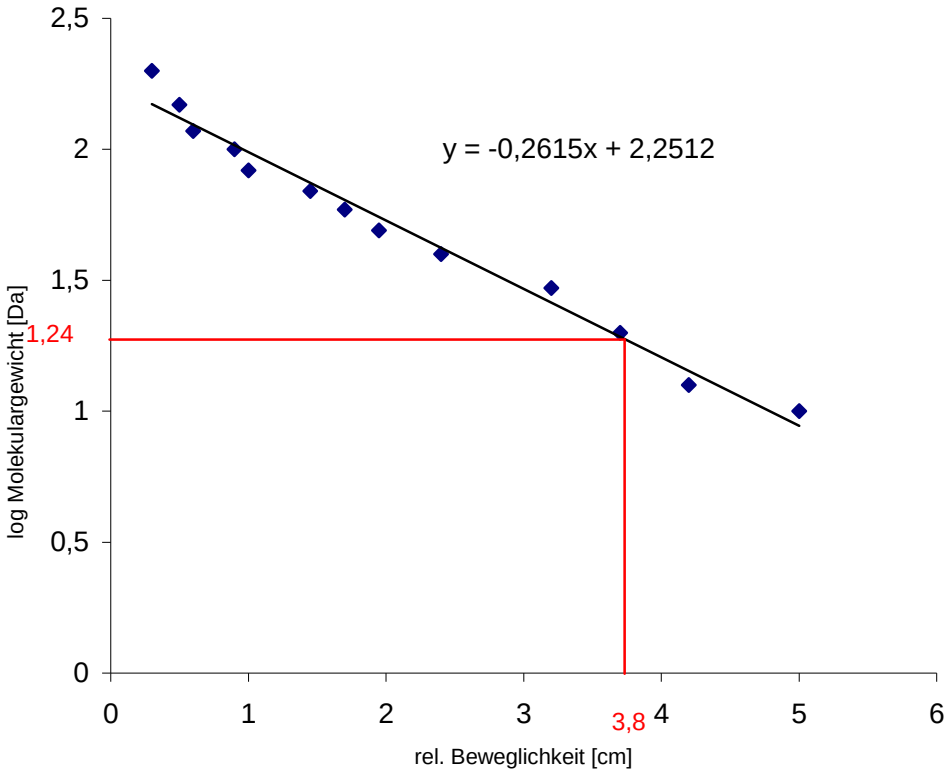

Abb. 17: Bestimmung der relativen molekularen Masse der gereinigten Protease aus *Paenibacillus sp.*. Die molekularen Massen der als Standards verwendeten Proteinleiter sind halblogarithmisch gegen ihre relative Beweglichkeiten im 10%igen Polyacrylamidgel aufgetragen. Die vertikale Linie zeigt die Wanderungsstrecke, die horizontale Linie die sich daraus ergebende molekulare Masse der unbekannten Protease.

Nach einem vergleichbaren SDS-PAGE-Lauf wurde das Gel anstatt mit Coomassie Brillantblau mit Silber-Färbung behandelt, um mögliche schwache Banden sichtbar zu machen (Abb. 18). Auf das Gel wurde neben dem Proteinstandard (A) der dialysierte Ammoniumsulfatniederschlag aufgetragen (B).

Wie in Abb. 18 zu erkennen ist, ergibt sich für das gereinigte Enzym aus *Paenibacillus sp.* nach der Gelfiltration in Spur (C) ebenfalls eine homogene Bande, so dass wesentliche Verunreinigungen ausgeschlossen werden können. Im Vergleich zu den aufgetragenen Proteinstandards wurde eine molekulare Masse von ca. 18 kDa bestimmt, in guter Übereinstimmung mit dem in Abb. 11 erhaltenem Wert.

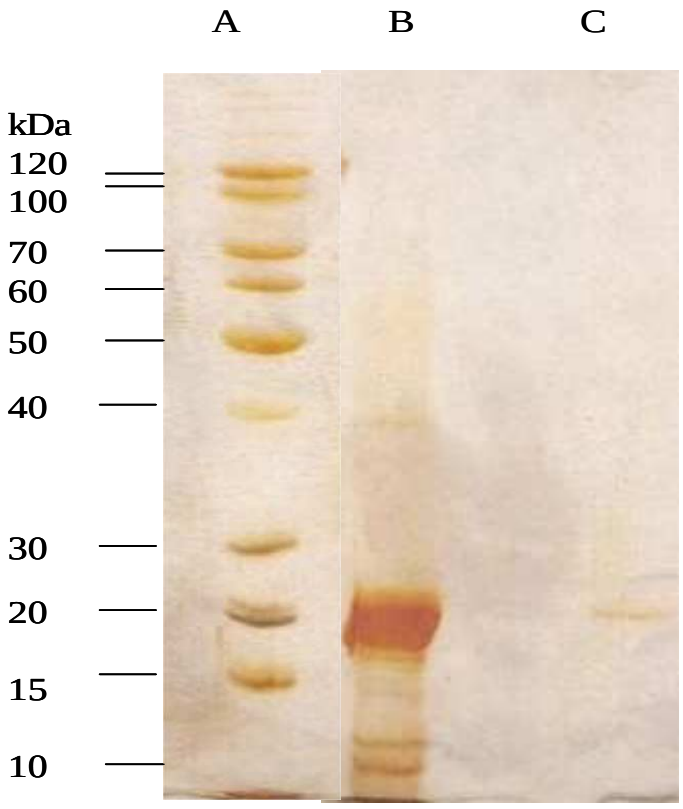

Abb. 18: . SDS-PAGE der gereinigten Protease aus *Paenibacillus sp.*
A) Proteinstandards mit Angabe der relativen molekularen Massen; B) Ammoniumsulfatniederschlag (10,6 µg); (c) Eluat nach Gelfiltration (0,64µg). Das Gel wurde mit Silbernitrat gefärbt.

3.2.4.2 2D-Elektrophorese

Die isolierten Protease aus *Paenibacillus sp*. zeigt zwar in der SDS-PAGE eine homogene Bande, was auf vollständige Reinheit schließen lässt, eine Verunreinigung genau an der gleichen Position wie die der Protease kann aber nicht völlig ausgeschlossen werden. Ein sehr gutes Reinigungskriterium ist die kombinierte Technik der isoelektrischen Fokussierung (IEF) und SDS-PAGE in der 2D-Elektrophorese, die sowohl nach Ladung beziehungsweise dem isoelektrischen Punkt, wie nach Größe trennt. Dieser Methode wurde die isolierte Protease aus *Paenibacillus sp*. nach der Ammoniumsulfatpräzipitation und der Gelfiltrationschromatographie unterworfen. In der ersten Dimension der 2D-Elektrophorese erfolgte die Auftrennung nach dem isoelektrischen Punkt durch stufenweisen Spannungsanstieg von 200 V auf 2000 V. Während der zweistündigen Trennung wanderten die Proteine im elektrischen Feld, bis sie an dem ihrem isoelektrischen Punkt entsprechenden pH-Wert im Gel fokussierten. Die im Fokussierungsstreifen gesammelten Proteine wurde im zweiten Schritt in einer diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli (1970) bei 200 V und 30 mA aufgetrennt. Dabei wurden die Disulfidbrücken durch eine Reduktionsreaktion mit DTT getrennt. Anschließend wurden die Sulfhydryl-Gruppen in einem Alkylierungsschritt umgesetzt um die Wiedervereinigung zu verhindern (s. Abschn. 6.2.6.3). Nach der Trennung in der zweiten Dimension wurden die Proteine mit Silberfärbung sichtbar gemacht.

Die 2D-Elektrophorese des Ammoniumsulfatpräzipitats (Abb. 19) zeigt zwei deutliche Proteinflecken im alkalischen Bereich bei etwa pH 8. Der kleinere Proteinfleck liegt im Bereich einer molekularen Masse von ~ 18 kDa in Übereinstimmung mit dem in der eindimensionalen SDS-PAGE bereits bestimmten Wert für Protease aus *Paenibacillus sp.* Der größeren Fleck liegt im Bereich einer molekularen Masse um 40 kDa und könnte möglicherweise aus mehreren Komponenten zusammengesetzt sein. Dieser Proteinfleck wurde nicht weiter untersucht.

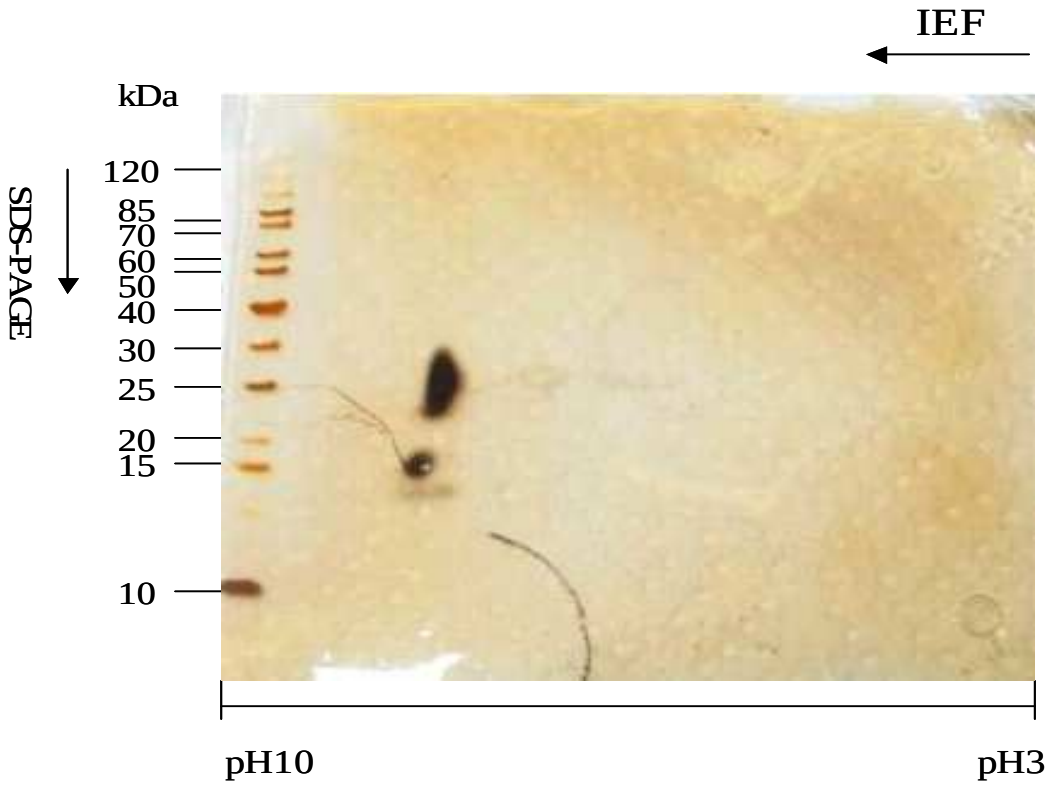

Abb. 19: 2D-Elektrophorese des aufgelösten, dialysierten Ammoniumsulfatniederschlags aus *Paenibacillus sp.* mit einem Proteingehalt von 5 µg. Die Trennung erfolgte in der ersten Dimension durch isoelektrische Fokussierung von 200-2000 V und in der zweiten Dimension in einem 10%igen SDS-Gel bei einer Stromstärke von 30 mA. Das Gel wurde mit Silbernitrat gefärbt.

In Abb. 20 ist das konzentrierte Eluat der Sephacrylsäule aufgetragen. Es ist nur noch ein Proteinfleck entsprechend einer molekularen Masse von ca. 18 kDa zu erkennen. Damit konnte mit Hilfe der 2D-Elektrophorese sowohl der isoelektrische Punkt der Protease aus *Paenibacillus sp.* im Bereich von pH 8.0 lokalisiert, wie auch deren Reinheit nachgewiesen werden.

Für eine genauere Interpretation der auf dem Gel in Form von Flecken akkumulierten Proteine müssen besondere Techniken angewendet werden wie beispielsweise eine Sequenzanalyse mittels Edman-Abbau oder moderne Spektroskopieverfahren wie „MALDI-TOF-MS“ oder „LC-NMR-MS“ (Dachtler *et al.*, 2000).

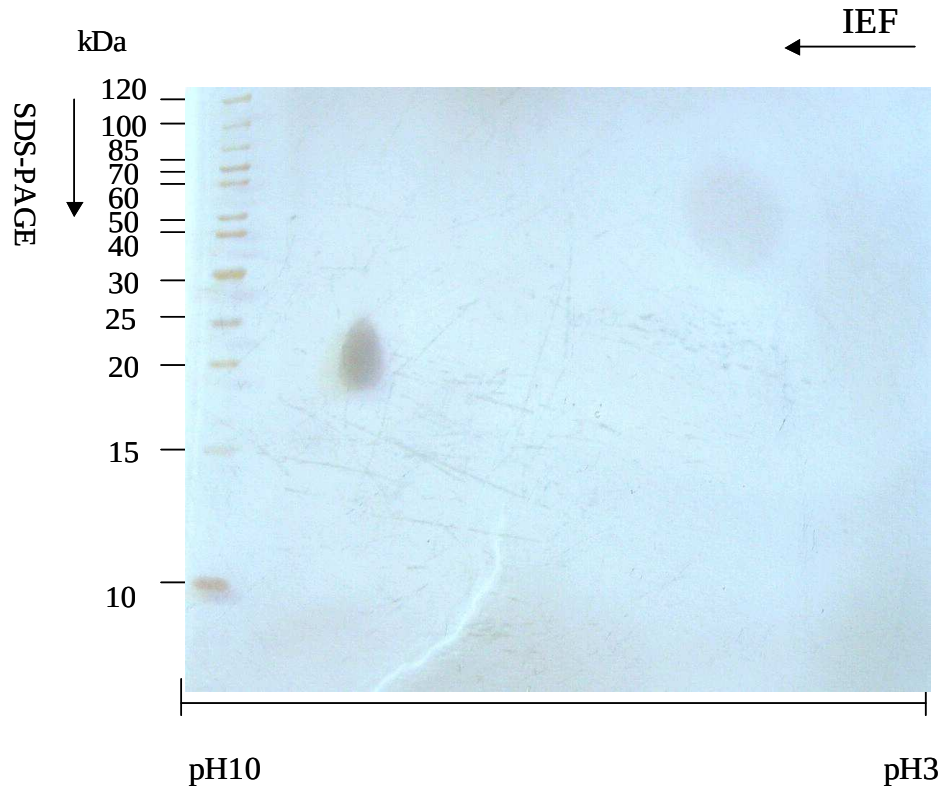

Abb. 20: 2D-Elektrophorese der gereinigten Protease aus *Paenibacillus sp.* nach Gelfiltration. Es wurden 10 µg Protein aufgetragen. Die Trennung erfolgte in der ersten Dimension nach dem isoelektrischen Punkt (IEF) von 200-2000 V, in der zweiten Dimension in einem 10%igen SDS-Gel (SDS-PAGE) bei einer Stromstärke von 30 mA.

3.2.4.3 Zymographie

Ein direkter Aktivitätsnachweis der isolierten Protease aus *Paenibacillus sp.* im Polyacrylamidgel wurde, wie bereits für die Protease aus *S. thermovulgaris* beschrieben (s. Abschn. 3.1.6.3), durchgeführt. Es wurden 30 µl des Eluats der Sephacrylsäule der Protease aus *Paenibacillus sp.* mit einem Proteingehalt von 40 µg auf das mit 0,1%iger Gelatine copolymerisierte Gel aufgetragen. Auf dem in Abb. 21 gezeigten Zymogramm ist eine einzelne breite Bande im Größenbereich der gereinigten Protease aus *Paenibacillus sp.* von ~ 18 000 (vgl. Abb. 16) zu erkennen.

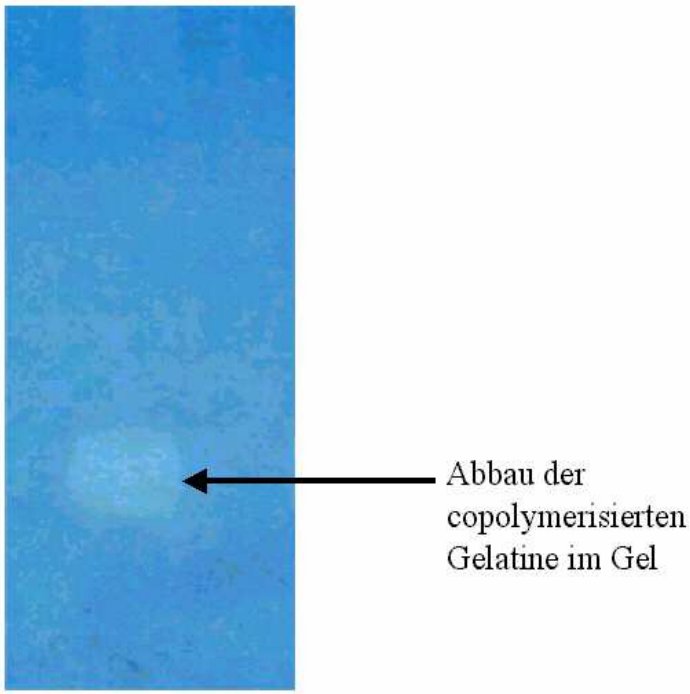

Abb. 21: Zymographische Aktivitätsbestimmung der gereinigten Protease aus *Paenibacillus sp* mit einem Proteingehalt von 3,4 µg nach der Gelfiltrations-chromatographie. Die Trennung erfolgte in einer 10 %igen PAGE, copolymerisiert mit einer 0,1%igen Gelatinelösung. Die Elektrophorese erfolgte bei 28 mA.

3.2.5 Bestimmung der molekularen Masse durch Gelfiltration

Die native Größe der isolierten Protease aus *Paenibacillus* sp. wurde wie bei der Protease aus *S. thermovulgaris* durch Gelfiltration an Sephacryl S-200 (vgl. Abschn. 3.2.5) bestimmt. Als Größenstandards dienten Katalase aus Rinderleber (240 kDa), Lactat-Dehydrogenase (LDH) aus Schweineherz (140 kDa), und Hämoglobin aus Rinderblut (67 kDa).

Die Standardproteine wurden zusammen mit der unbekannten Protease auf die mit 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5 äquilibrierte Säule aufgetragen und mit einer Flussrate von etwa 0,8 ml/min mit dem gleichen Puffer eluiert. Es wurden Fraktionen von je 2 ml gesammelt. Die Enzymaktivität der Protease wurde mit dem Azocasein-Test bei 350 nm gemessen, die Absorption von Hämoglobin bei 404 nm. Die Aktivitätsmessungen von Katalase, LDH und Trypsin erfolgten nach den in Abschnitt 6.2.8 beschriebenen Testverfahren. In Abb. 22 sind die Messwerte in einem Elutionsprofil gegen die Fraktionsnummern aufgetragen.

Es ist zu erkennen, dass die Aktivität der Protease aus *Paenibacillus sp*. im niederen Molmassenbereich nach dem Hämoglobin eluiert wurden.

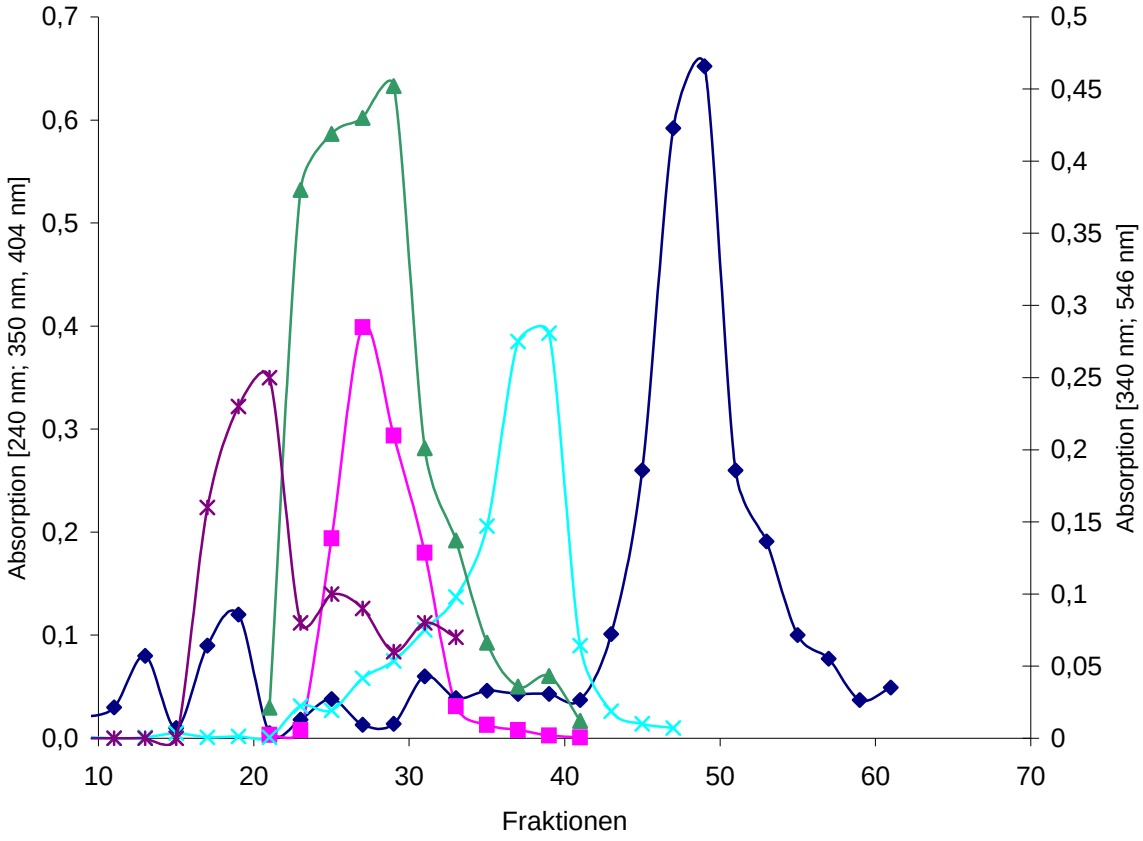

Abb. 22: Größenbestimmung der Protease aus *Paenibacillus sp.* an Sephacryl S-200 (90 cm, 2cm).

Folgende Standardsubstanzen bekannter Masse wurden aufgetragen: Katalase 0,1 mg; Hämoglobin 1mg, LDH 1mg, sowie Dextranblau zur Bestimmung des Ausschlussvolumens und die Protease aus *Paenibacillus sp.* 1,65 mg.

Die Elution der Substanzen erfolgte mit 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5. Es wurden Fraktionen mit jeweils 3 ml gesammelt. Die linke Absorptionsskala zeigt die Bestimmung der Aktivität von Katalase bei 240 nm über die Reduktion von H_2O_2 zu H_2O (■), von Hämoglobin bei 404 nm (×), und die Absorption der Protease aus *Paenibacillus sp*. bei 350 nm (◆) über Reduktion von Pyruvat zu Lactat.

Die rechte Absorptionsskala zeigt die Absorption von LDH. bei 340 nm (▲) und die Absorption von Dextranblau bei 546 nm (✳).

Tabelle 5: Molmassen und Elutionsvolumina der Eichproteine und der Protease aus *Paenibacillus sp.* für die Gelfiltration auf Sephacryl S-200.

Substanzen	Molekulare Masse [Da]	Elutionsvolumen [ml]
Katalase	240000	108
LDH	140000	118
Hämoglobin	67000	146
Protease aus *Paenibacillus sp.*	14450	158

In Abb. 14 sind die ermittelten Elutionsvolumina der Eichproteine gegen den Logarithmus der Molmassen aufgetragen. Aus der linearen Regression wurde die Masse des isolierten Enzyms zu 14,45 kDa bestimmt.

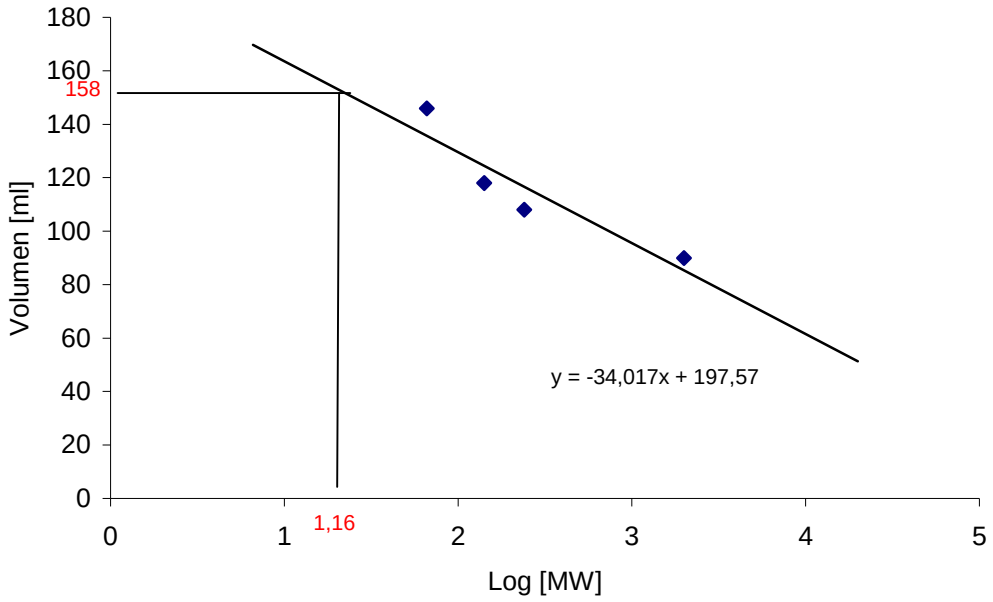

Abb. 23: Elutionsvolumina der Eichproteine Katalase, LDH und Hämoglobin und nach Gelfiltration auf Sephacryl S-200 in Abhängigkeit vom Logarithmus ihrer molekularen Massen. Die vertikalen bzw. horizontalen Linien zeigen das Elutionsvolumen und die sich daraus ergebende Molmasse für die Protease aus *Paenibacillus sp.*

3.2.6 Überblick über die Reinigungsverfahren der Proteasen aus *S. thermovulgaris* und *Paenibacillus sp.*

In dieser Arbeit ist es gelungen, zwei verschiedene Proteasen aus den Bakterienstämme *S. thermovulgaris* und *Paenibacillus sp.* in reiner Form zu isolieren. Einen Überblick über Kultivierung und Reinigungsverfahren beider Enzymaktivitäten zeigt das Schema in Abb. 24.

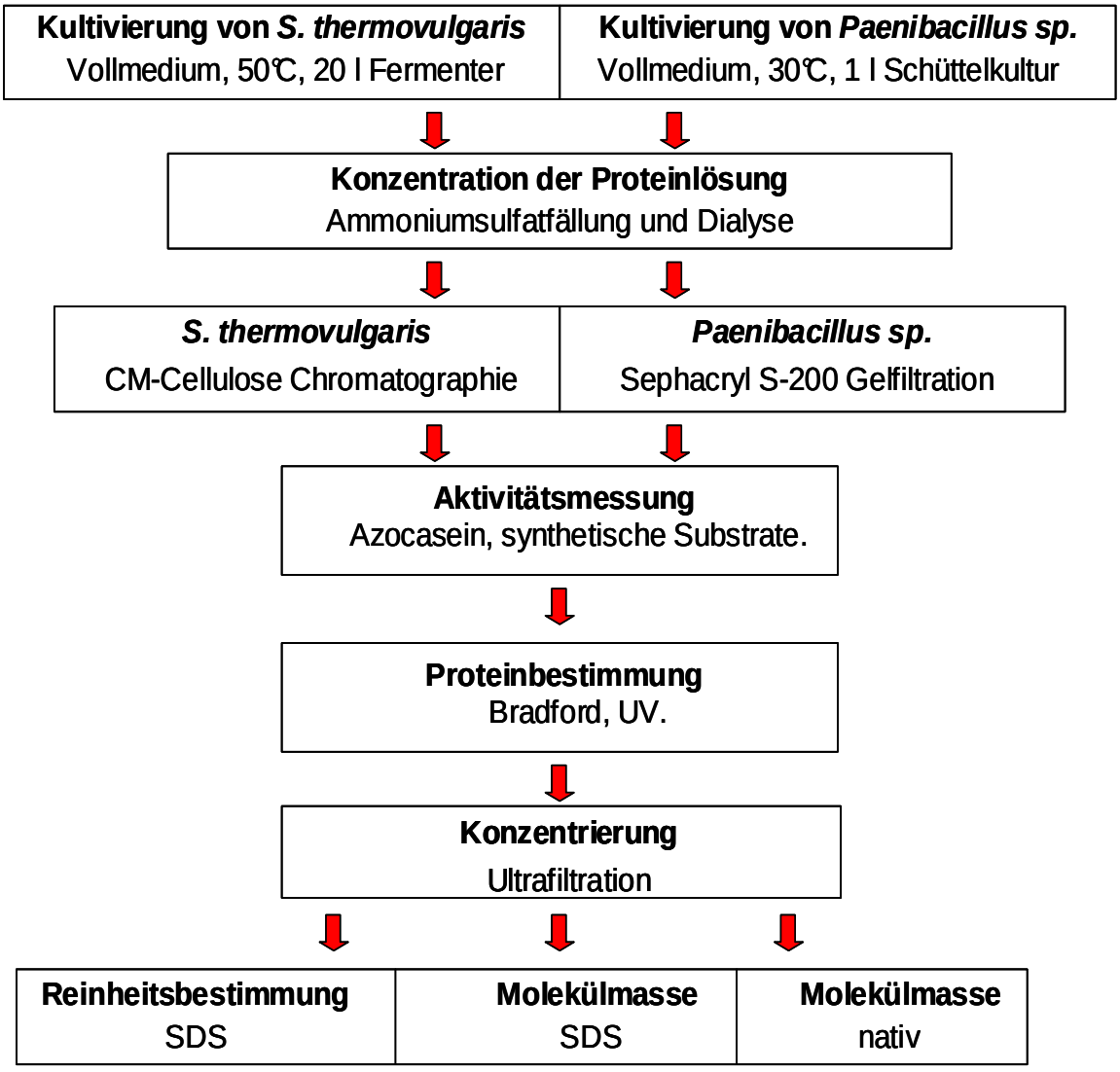

Abb. 24: Schematische Darstellung der Reinigungsprozeduren der extrazellulären Proteasen aus *S. thermovulgaris* und *Paenibacillus sp*.

3.3 Charakterisierung der extrazellulären Proteasen aus *S. thermovulgaris und Paenibacillus sp.*

3.3.1 Substratspezifität

Zum Nachweis der Proteaseaktivität bei der Reinigung extrazellulärer Proteasen wurde zunächst Azocasein als universelles Proteinsubstrat eingesetzt, das von Proteasen unabhängig von ihrer jeweiligen Spezifität angegriffen werden kann. Daher konnte zunächst keine Zuordnung der gereinigten Proteasen zu einer der vier Proteaseklassen getroffen werden. Durch den Einsatz synthetischer Substrate mit bekannten Peptidbindungen, die sich bezüglich ihrer Art und Anzahl der Aminosäurereste bzw. der Schutzgruppen unterscheiden, wurde versucht, die Spezifität der isolierten Proteasen zu charakterisieren.

3.3.1.1 Benzoyl-arginin-p-nitroanilid (BAPNA)

BAPNA ist aufgrund seines ausgeprägt basischen Argininrests ein spezifisches Substrat für trypsin-ähnliche Protease-Aktivitäten, die bei Abspaltung der p-Nitroanilid-Gruppe durch Zunahme der Absorption bei 405 nm detektiert werden. Weder bei der aus *S. thermovulgaris* als auch bei der aus *Paenibacillus sp*. isolierten Protease waren nennenswerte Aktivitätszunahmen zu erkennen. Beide Proteasen spalten offensichtlich nicht an den Arginin-Resten und besitzen somit keine trypsinähnliche Spezifitäten.

3.3.1.2 Succinyl-phenylalanin-p-nitroanilid (SUPHEPA) und Benzoyl-tyrosin-p-nitroanilid (BTPA)

Die beiden Substrate SUPHEPA und BTPA besitzen aromatische Aminosäureresten und dienen damit dem Nachweis chymotrypsin-ähnlicher Aktivitäten. Auch hier wird die Aktivität durch die Absorptionsänderung bei 405 nm infolge der Freisetzung des Chromophors Nitroanilid detektiert. Eine signifikante Aktivitätszunahme mit steigender Enzymkonzentration konnte mit diesen Substraten bei der Protease aus

S. thermovulgaris beobachtet werden.

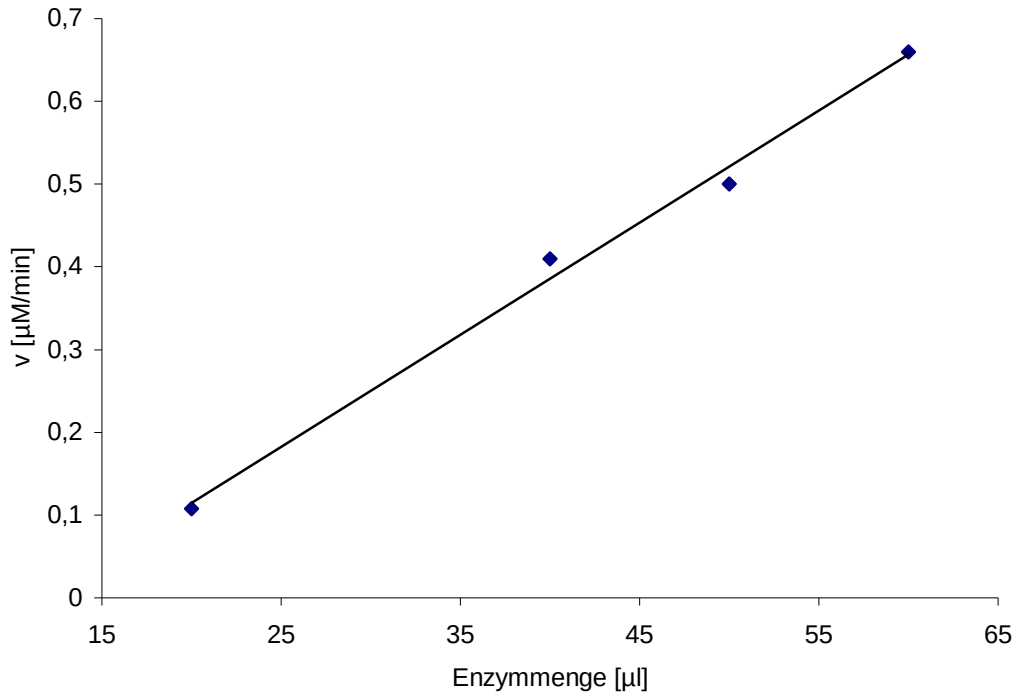

Abb. 25: Aktivitätsmessung der Protease aus *S. thermovulgaris* mit 2 mM SUPHEPA bei 405 nm. Die Messung erfolgte für 5 min an einem thermostatisierbaren Photometer bei 50°C. Die eingesetzte Proteaselösung hatte eine Proteinkonzentration von 20 µg.

Abb. 25 zeigt die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von unterschiedlichen Proteasemengen von *S. thermovulgaris* bei einer konstanten Konzentration des Substrates SUPHEPA von 2mM. Es ist eine klare lineare Zunahme zu erkennen. Damit kann die Protease aus *S. thermovulgaris* dem Chymotrypsintyp zugeordnet werden. Auch mit BTPA konnte ein deutlicher Umsatz gefunden werden, was die Chymotrypsinspezifität unterstreicht.

Mit der Protease aus *Paenibacillus sp.* konnte dagegen kein eindeutiges Ergebnis mit den Substraten SUPHEPA und BTPA gefunden werden.

3.3.1.3 Benzoyl-tyrosin-ethylester (BTEE)

Das Substrat BTEE dient zur Detektion der Esterase-Aktivität chymotrypsin-ähnlicher Proteasen. In Abb. 26 ist der Zusammenhang zwischen Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit bei konstanter Menge der Protease aus *Paenibacillus sp.* dargestellt. Es zeigt sich eine typische Sättigungskurve, die auch für dieses Enzym das Vorliegen einer chymotrypsin-ähnlichen Protease annehmen lässt.

.

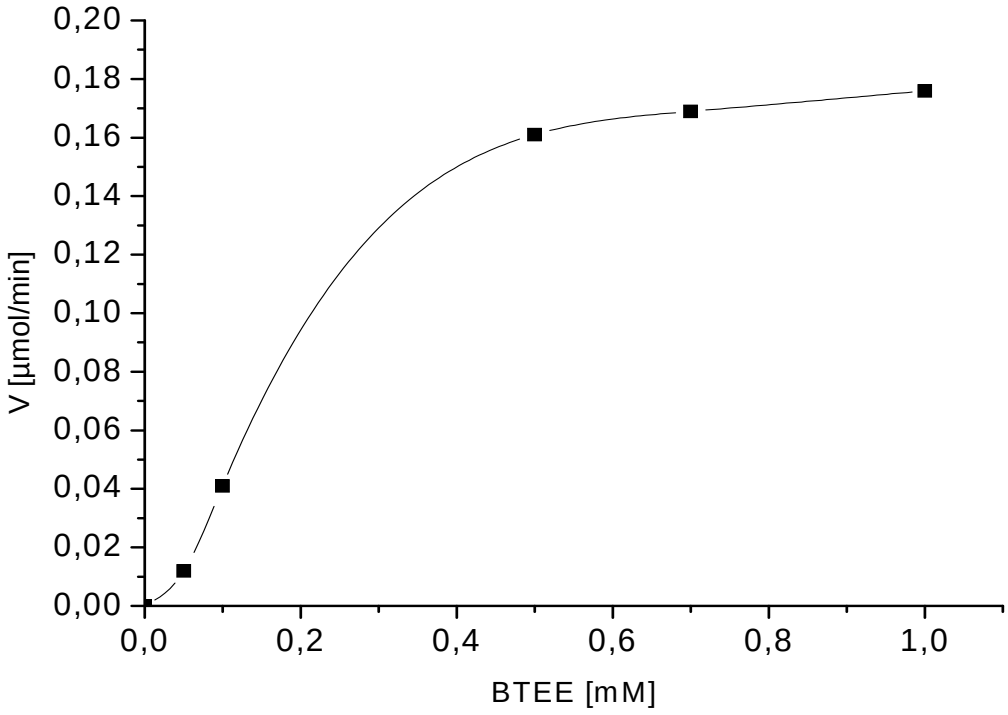

Abb. 26: Abhängigkeit der Aktivität der Protease aus *Paenibacillus sp.*(20 µg) von der Konzentration an BTEE.

.

Über die linearisierte Auftragung nach Lineweaver-Burk in Abb. 27 wurde die Michaeliskonstante zu K_m = 0,35 mM sowie die maximale Rektionsgeschwindigkeit zu V_{max} = 0,255 µmol/min mit Hilfe des EKI-Programms bestimmt. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Aktivitätsmessungen sind zusammenfassend in Tabelle 6 dargestellt.

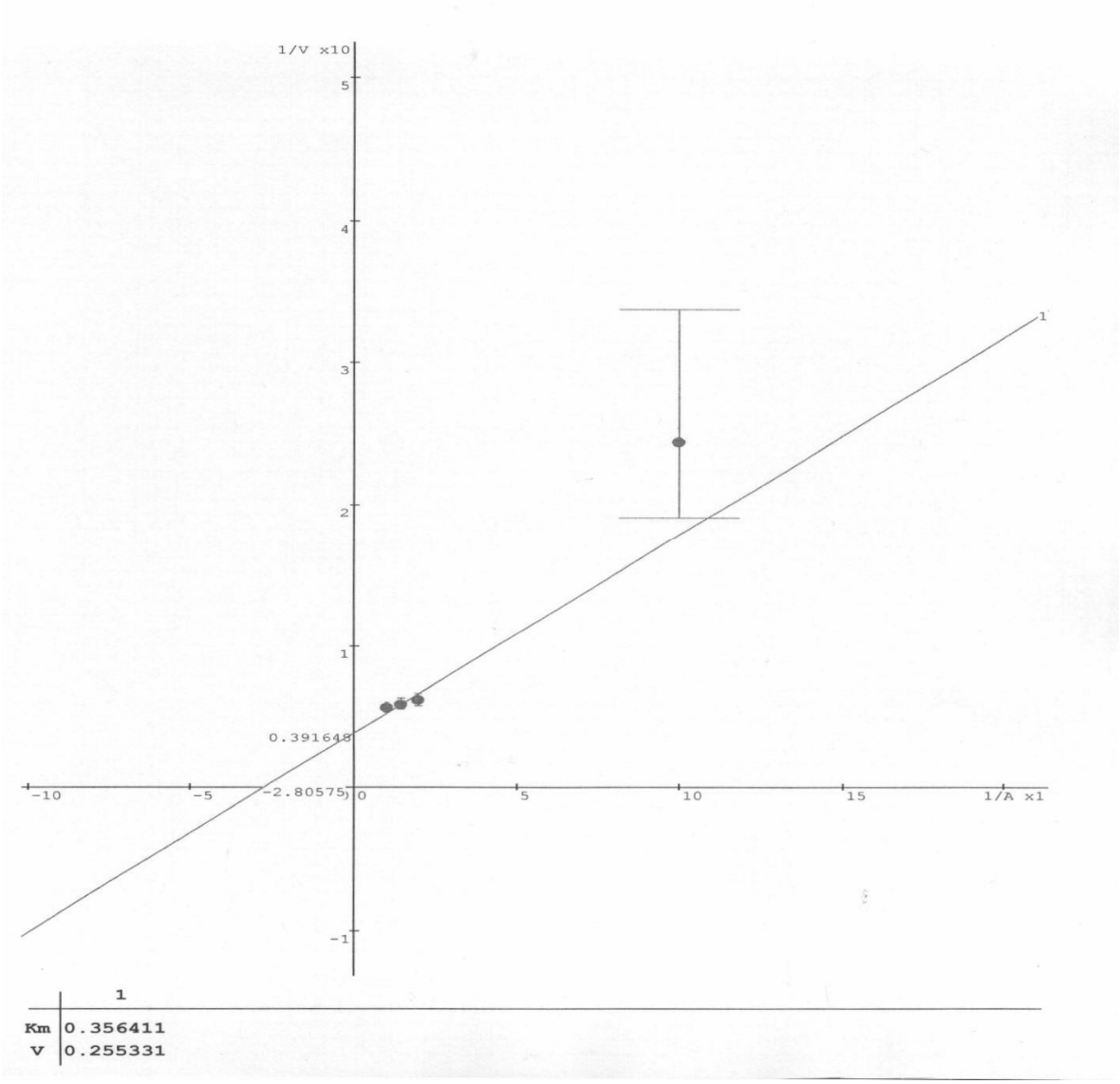

Abb. 27: Doppel-reziproke Auftragung der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentrationen an BTEE nach Abb. 18 zur Bestimmung der Michaeliskonstante K_m.

Tabelle 6: Übersicht über die Substratspezifität der isolierten Proteasen aus *S. thermovulgaris* und *Paenibacillus sp.*

Verwendete Substrate	**Protease aus *S. thermovulgaris***	**Protease aus *Paenibacillus sp.***
Benzoyl-arginin-p-nitroanilid (BAPNA)	-	-
Succinyl-phenylanilin-p-nitroanilid (SUPHEPA)	+	n.d.
Benzoyl-tyrosin-p-nitroanilid (BTPA)	+	n.d.
Benzoyl-tyrosin-ethylester (BTEE)	+	+

n.d. nicht detektierbar (Niederschlag)

Die Ergebnissen lassen darauf schließen, dass die aus den beiden Mikroorganismen isolierten Proteasen den Serinproteasen von Chymotrypsin-Typ zuzuordnen sind. Die Protease aus *S. thermovulgaris* spaltet dabei nach beiden aromatischen Aminosäureresten Phenylalanin und Tyrosin, während die Protease aus *Paenibacillus sp.* bevorzugt nach Tyrosinresten spaltet. Zur Absicherung dieser Annahme wurden mit beiden Proteasen Hemmstudien mit Inhibitoren unterschiedlicher Spezifität unternommen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen aus beiden Mikroorganismen sind im folgenden Abschnitt dargestellt.

3.3.2 Enzymhemmung

Für die folgenden Hemmstudien wurden Hemmstoffe mit unterschiedlichen Wirksamkeiten gegen Serin-, Cystein- und Metalloproteasen verwendet. Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) ist ein Inhibitor für Metalloproteasen, der durch Komplexbildung divalente Metallionen, welche für Katalyse und Struktur essentiell sind, abfängt und dadurch das Enzym inaktiviert. Als weiterer Hemmstoff kam 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid-hydrochlorid, welcher unter den Handelsname Pefabloc sc. bekannt ist, zum Einsatz. Es handelt sich um einen spezifischen irreversiblen Hemmstoff für Serinproteasen. Er hat den Vorteil, dass er nicht toxisch, aber wasserlöslich und stabil ist. Als Hemmstoff für Serinproteasen wurde weiterhin Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) eingesetzt, ein ebenfalls irreversibler Inhibitor, welcher Cystein oder Serin im aktiven Zentrum sulfoniert. PMSF ist neurotoxisch, wenig stabil in wässriger Lösung und hat eine kurze Halbwertszeit (James 1978). *Trans*-Epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)-butan (E-64) ist eine spezifischer Inhibitor für Cysteinprotease. Aprotinin und Chymostatin sind weniger spezifische, reversible Hemmstoffe sowohl für Serinproteasen vom Chymotrypsin-Typ als auch für Cysteinproteasen. Serin- wie Cysteinproteasen werden auch durch die mehr unspeziefischen Inhibitoren 1-Chlor-3-tosylamido-7-amino-2-heptanon-HCl (TLCK) und 1-Chlor-3-tosylamido-4-phenyl-2-butanon (TPCK) gehemmt.

3.3.2.1 *S. thermovulgaris*

Die Protease aus *S. thermovulgaris* wurde in einen Zeitraum von 0-180 min bei 22°C mit verschiedenen Hemmstoffen unterschiedlicher Spezifität inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität mittels Azocaseintest bei 50°C bestimmt. Die Ausgangskonzentrationen der Hemmstoffe wurden gemäß Angaben des Herstellers (Boehringer Mannheim) eingesetzt.

Die beiden Hemmstoffe Aprotinin (0,05 mM), und Pefabloc sc. (0,5 mM), konnten keine deutliche Aktivitätsabnahme der Protease aus *S. thermovulgaris* bewirken.

Auch EDTA (5 mM), zeigte keine Wirkung, so dass essentielle Metallionen ausgeschlossen werden können. Mit den unspezifischen Hemmstoffen TLCK (1 mM) und TPCK (1 mM) konnte ebenfalls keine aussagekräftigen Aktivitätsabnahmen detektiert werden.

Mit PMSF verlor die Protease *S. thermovulgaris* nach einer Inkubationszeit von 30 min über 50 % an ihrer Aktivität (Abb. 28). Der zeitabhängige exponentielle Abfall der Enzymaktivität ist auch ein Hinweis für die Irreversibilität der Hemmung.

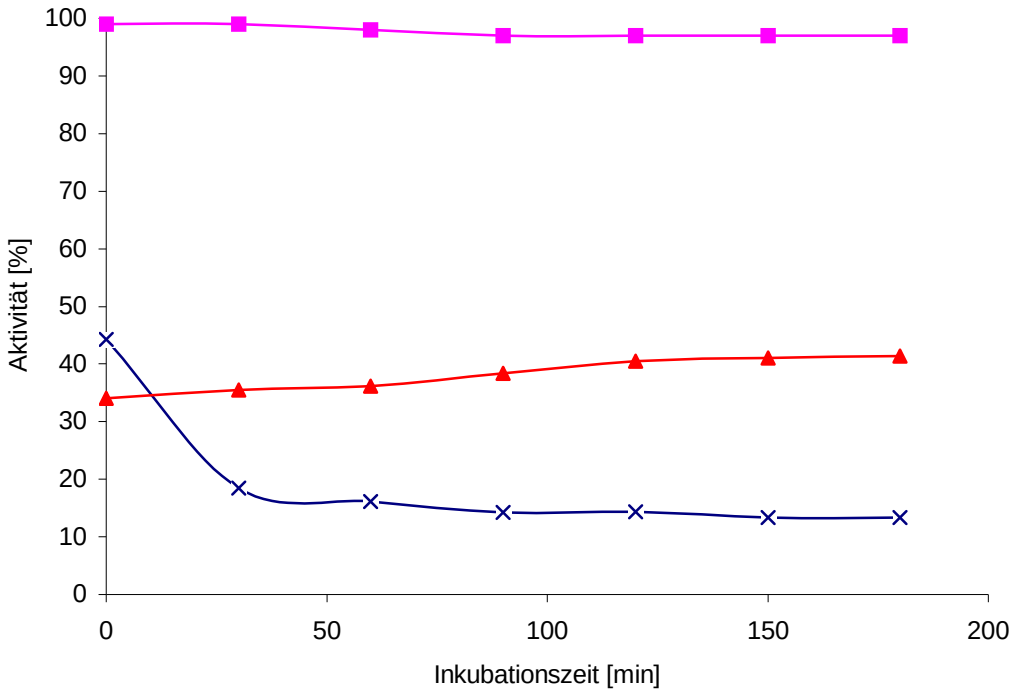

Abb. 28: Zeitabhängigkeit der Hemmung der Protease aus *S. thermovulgaris* durch Einwirkung von PMSF (×), Chymostatin (▲) und E-64 (■).
Zu 150 µl der Protease wurden 50 µl der jeweiligen Hemmstoffe gegeben und für die auf der Abzisse angegebene Zeit inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität mittels Azocasein bei 350 nm getestet. Die Werte sind bezogen auf 100% Enzymaktivität in Abwesenheit von Hemmstoff.

Mit Chymostatin konnte bei einer Konzentration von 50 µM eine sofortige 60%ige Aktivitätsabnahme der Protease aus *S. thermovulgaris* beobachtet werden. Diese reduzierte Aktivität blieb über 3 h konstant, was für die Reversibilität der Hemmung spricht. Mit E-64 in einer Konzentration von 10 µM wurde jedoch keinerlei Hemmung beobachtet (Abb. 28). Wie in der Abbildung deutlich zu erkennen ist, konnte keine Aktivitätsabnahme detektiert werden. Zusammenfassend ergab sich, dass von den so getesteten Hemmstoffen nur Chymostatin und PMSF eine nachweisbare Hemmwirkung zeigten. Um diese Hemmung genauer zu charakterisieren wurden diese beiden Hemmstoffe zusammen mit E-64 und Pefabloc sc. in verschiedenen Ausgangskonzentrationen eingesetzt, für PMSF (0,1-1 mM), Pefabloc sc. (0,5-5 mM), Chymostatin (0,005-0,05 mM) und E-64 (1-10 µM), wobei das Enzym vor dem eigentlichen Proteasetest mit Azocasein für 2 h mit dem Hemmstoff vorinkubiert wurde (s. Abb. 29).

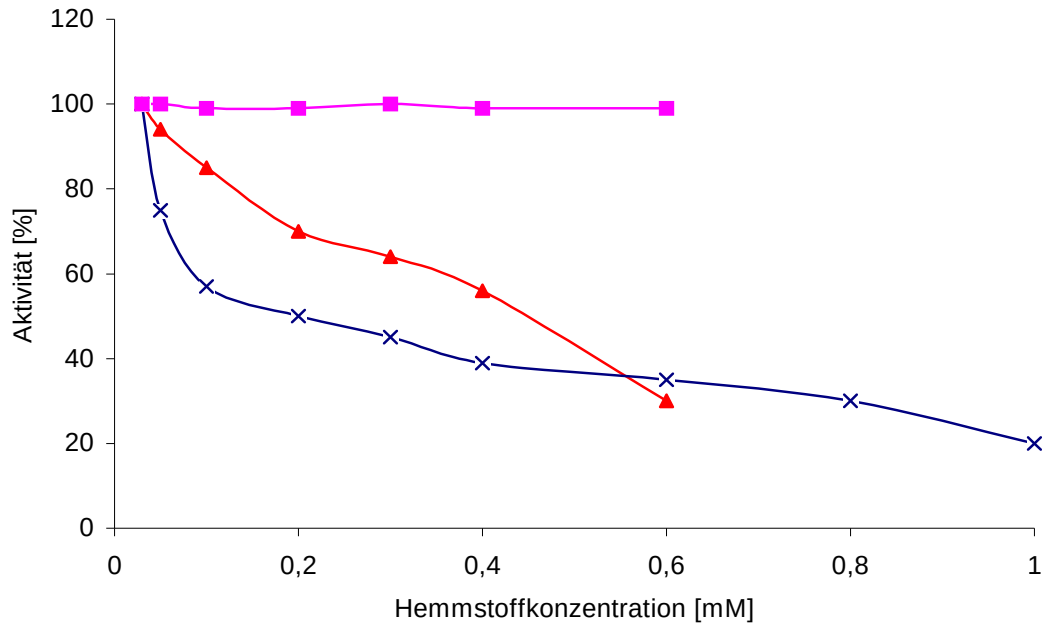

Abb. 29: Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung der Protease aus *S. thermovulgaris* unter Einwirkung von PMSF (×), Chymostatin (▲) und E-64 (■). Die Protease wurde für 2h bei 22°C inkubiert und die Aktivität anschließend mit Azocasein getestet.

Wie aus Abb. 29 ersichtlich ist, nahm die Aktivität mit steigender Konzentration von PMSF und Chymostatin deutlich ab. Die Anfangswerte der Aktivität ohne Hemmstoff wurden dabei zur besseren Vergleichbarkeit auf 100% gesetzt. E-64 zeigt auch hier bis zu einer Konzentration von über 40 µM keine Hemmung. Demnach lässt sich das isolierte Enzym aus *S. thermovulgaris* als eine Serinprotease vom Typ Chymotrypsin identifizieren, was die erhaltenen Ergebnisse der Substrat-Spezifität bestätigt.

3.3.2.2 *Paenibacillus sp.*

Die Protease aus *Paenibacillus sp*. wurde in gleicher Weise wie schon für die Protease aus *S. thermovulgaris* beschrieben auf Hemmbarkeit durch verschiedene proteasen untersucht. das Enzym wurde für 3h mit Hemmstoffen unterschiedlicher Spezifität vorinkubiert und anschließend die Proteaseaktivität mit Azocasein bei 30°C getestet. PMSF ergab eine eindeutige Reduzierung der Enzymaktivität. Nach 30minütiger Inkubation verlor das Enzym bereits über 40 % seiner Aktivität. Dies und der weitere exponentielle Abfall innerhalb 3h auf etwa 10 % deutete darauf hin, dass es sich auch bei diesem Enzym um eine Serinprotease handelt. Auch durch die deutliche Hemmwirkung des irreversiblen Serinprotease-Inhibitors Pefabloc bestätigt diese Annahme.

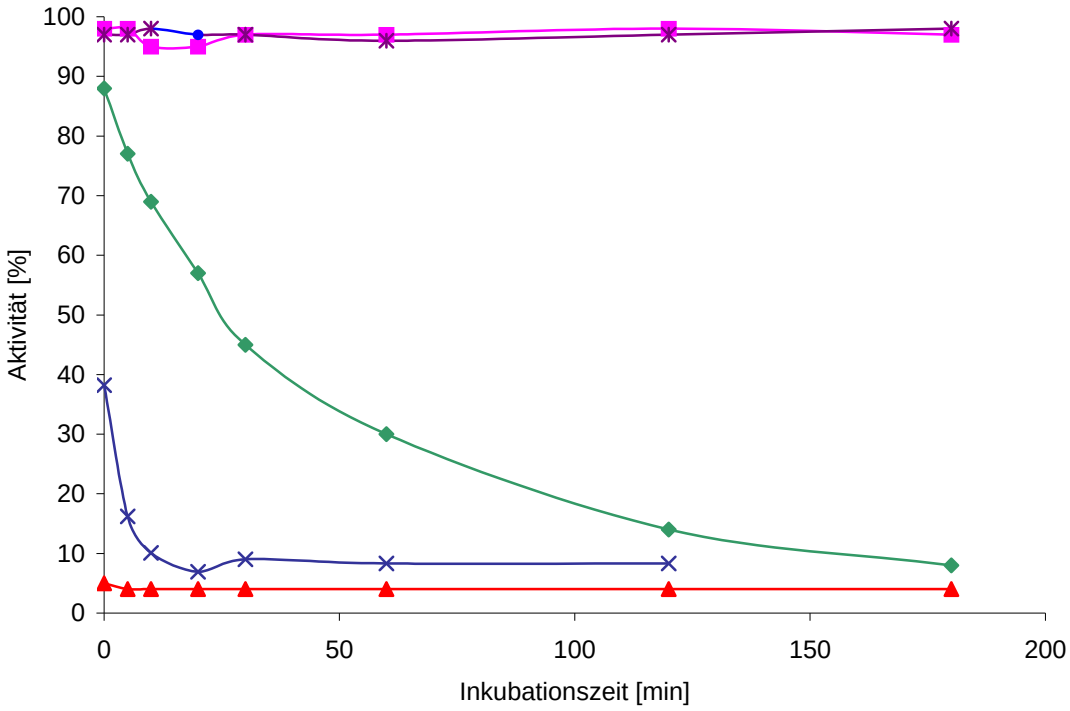

Abb. 30: Zeitabhängige Hemmung der Aktivität der isolierten Protease aus *Paenibacillus sp*. durch Pefabloc (◆), PMSF (×), Chymostatin (▲), E-64 (■) und EDTA (●). 150 µl der Protease wurden mit 50 µl der jeweiligen Hemmstoffe für 2 h inkubiert. Die Aktivität wurde mit Azocasein bei 350 nm getestet.

Chymostatin erwies sich hier als ein sehr effizienter Hemmstoff, der bei einer Konzentration von 50 µM die Enzymaktivität sofort zu über 95% hemmt. E-64 und EDTA blieben dagegen unwirksam, so dass Cystein- und Metalloproteasen ausgeschlossen werden konnten.

In einem weiteren Versuch wurde, wie bereits bei der Protease aus *S. thermovulgaris*, die Enzymaktivität in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von PMSF, Pefabloc und E-64 gemessen. Die Protease wurde in den auf der Abszisse angegebenen Konzentrationen für 2h bei Raumtemperatur vorinkubiert und anschießend die Enzymaktivität mit dem Azocaseintest gemessen. Die Messung ergab für PMSF und Pefabloc eine deutliche Aktivitätsabnahme, dagegen konnte mit E-64 keine Hemmung nachgewiesen werden (Abb. 31).

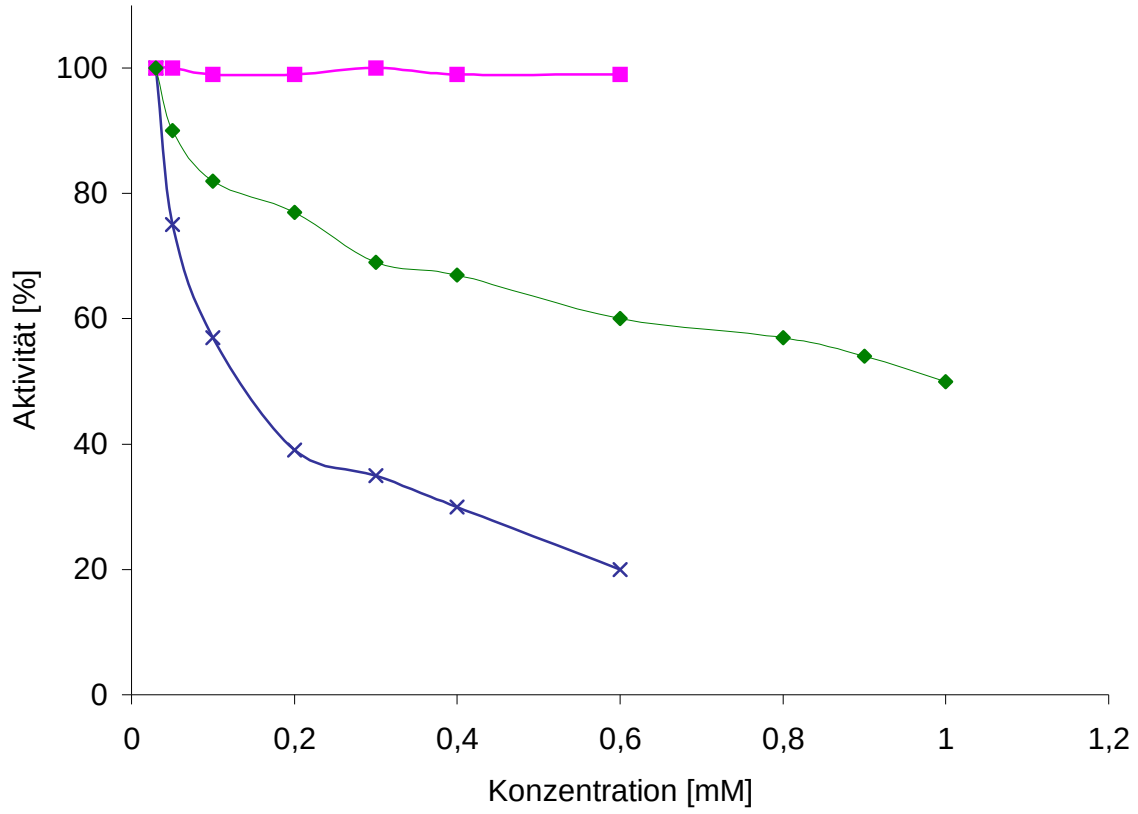

Abb. 31: Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung der Protease aus *Paenibacillus sp.* unter Einwirkung von PMSF (×), Pefabloc (◆) und E-64 (■). Die Protease wurde für 2 h bei Raumtemperatur vorinkubiert und anschließend die Aktivität mit Azocasein mit 350 nm getestet.

Die Ergebnisse der Hemmversuche sind für beide Proteasen in Tabelle 7 zusammenfassend dargestellt. Aus der Übersicht geht deutlich hervor, dass die beiden isolierten Proteasen den Serin-Proteasen unterzuordnen sind und somit die Ergebnisse der Substratspezifität bestätigen. Zudem konnte mit den Tests mit EDTA bewiesen werden, dass zweiwertige Metallionen weder für die Katalyse noch für die Struktur der Proteasen eine essentielle Rolle spielen und Metalloproteasen auszuschließen sind. Aufgrund der starken Hemmwirkung von Chymostatin und der fehlenden Hemmung durch E-64 konnte zudem der Schluss gezogen werden, dass es sich bei beiden Enzymen um chymotrypsinartige Proteasen handelt.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Wirkung verschiedener Inhibitoren auf die Aktivität der Proteasen aus *S. thermovulgaris* und *Paenibacillus sp.* +, deutliche Hemmung; -, keine Hemmung; n.d., nicht detektierbar

Hemmstoff	Beschreibung	Aktivitätsverlust bei *S. thermovulgaris*	Aktivitätsverlust bei *Paenibacillus sp.*
Aprotinin	Relativ unspezifisch, Reagiert reversibel mit vielen Serin-Proteasen und Esterasen	+	+
Pefabloc	Relativ unspezifisch, Reagiert irreversibel mit vielen Serin-Proteasen und Esterasen	+	+
TLCK	Unspezifischer Serin- und Cysteinprotease-Hemmer (irreversibel)	-	n.d.
TPCK	Unspezifischer Serin- und Cysteinprotease-Hemmer (irreversibel)	-	n.d.
Chymostatin	Spezifischer Inhibitor für chymotrypsin-ähnliche Proteasen	+	+
PMSF	Hemmt Serin-Proteasen sowie Papain und Acetylcholin Esterasen irreversibel	+	+
E-64	Spezifisch für Cystein-Protease	-	-
EDTA	Spezifisch für Metalloproteasen	-	-

3.3.3 Bestimmung des pH-Optimums

3.3.3.1 S. thermovulgaris

Die pH-Abhängigkeit der Enzymreaktion der thermophilen Protease aus *S. thermovulgaris* wurde im Bereich von 3-13 für bestimmt. Das Enzym wurde beim jeweiligen pH-Wert für 30 min vorinkubiert. Nach nochmaliger Überprüfung des pH-Wertes wurde die Aktivität mittels Azocasein bei 350 nm gemessen. Es ergab sich eine Optimumskurve mit einem Plateau mit maximaler Enzymaktivität im pH-Bereich zwischen 8 und 11 und einem steilen Abfall über pH 11 (Abb. 32). Die Protease hat demnach einen basischen Charakter.

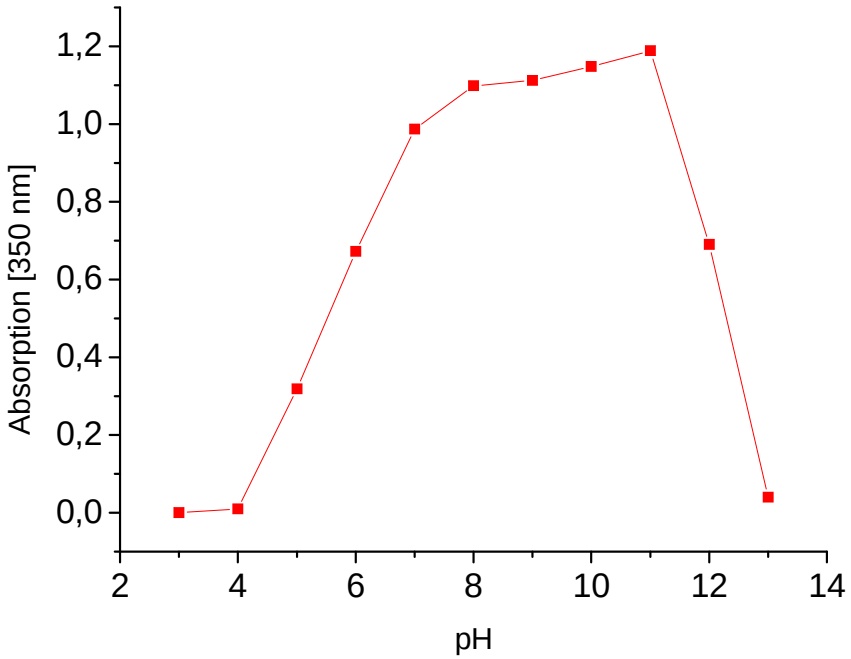

Abb. 32: pH-Verhalten der Enzymaktivität der thermophilen Protease aus *S. thermovulgaris.* Azocasein wurde in Teorell-Stenhagen-Puffer in den auf der Abszisse angegebenen pH-Werten angesetzt und die Aktivität nach 30minütiger Vorinkubation bei 50°C bei 350 nm gemessen.

3.3.3.2 *Paenibacillus sp.*

Die pH-Abhängigkeit der aus *Paenibacillus sp.* isolierten Protease wurde wie für das Enzym aus *S. thermovulgaris* beschrieben nach einer Vorinkubation von 30 min mittels des Azocaseintests bei 350 nm gemessen. Auch hier zeigt sich eine Optimumskurve mit einem Maximum im alkalischen Bereich bei pH 9 (Abb. 33). Nach Überschreiten dieses pH-Wertes nimmt die Aktivität der Protease stark ab, bis schließlich bei pH 12 nur noch minimale Absorption detektierbar ist.

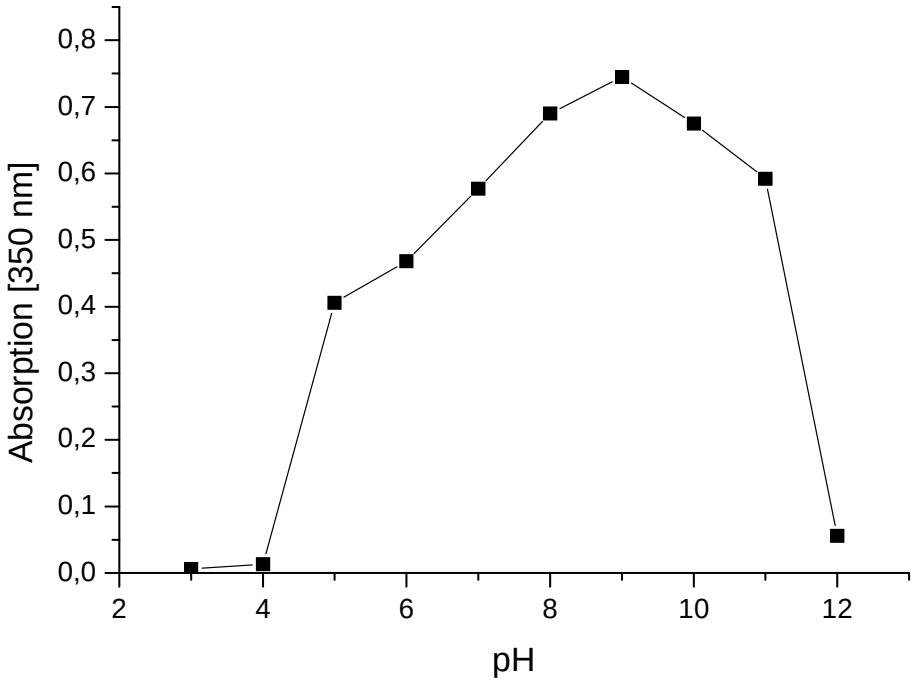

Abb. 33: Bestimmung des pH-Optimums der thermophilen Protease aus *Paenibacillus sp.* Das Substrat Azocasein wurde in Teorell-Stenhagen-Puffer mit pH-Werten von 3-12 gelöst und das Enzym mit diesen Azocaseinlösungen bei 30°C für 30 min vorinkubiert. Die Aktivität wurde bei 350 nm gemessen.

3.3.4 Temperaturabhängigkeit

3.3.4.1 S. *thermovulgaris*

Bei diesem Versuch wurde die Abhängigkeit der Enzymaktivität der isolierten Proteasen gegenüber direkten Temperatureinflüssen untersucht. 200 µl der Enzymlösung wurde zusammen mit 0,2% (w/v) Azocasein bei unterschiedlichen Temperaturen in Bereich von 4-90°C für 30 min inkubiert. Bei jeder Temperatur wurde noch ein Leerwert ohne Enzym inkubiert.

Abb. 34 zeigt deutlich, dass die Aktivität der Protease mit steigender Temperatur bis zu einem Maximum bei 65°C zunimmt. Bei noch höheren Temperaturen beobachtet man einen steilen Abfall der Kurve.

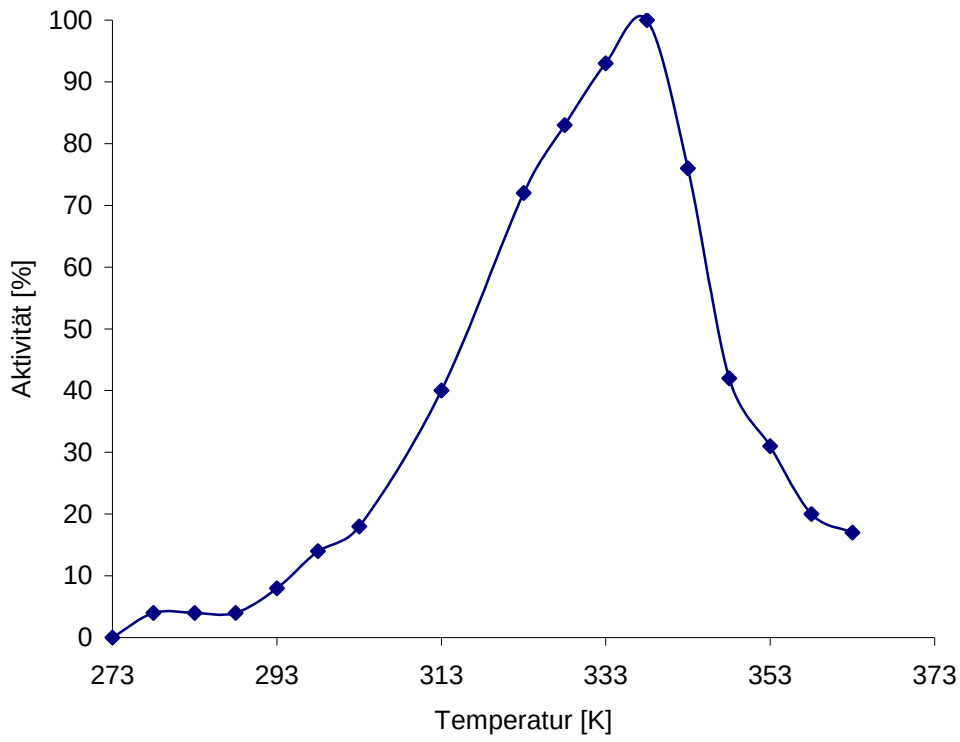

Abb. 34: Abhängigkeit der Aktivitäten der Protease aus *S. thermovulgaris* gegenüber unterschiedlichen Temperaturen von 4-90°C. Die Protease wurde bei jeder Temperatur für 1 h inkubiert. Die Aktivität wurde anschließend mit dem Azocasein Test bei 50°C gemessen.

Über die Auftragung nach Arrhenius kann die Aktivierungsenergie der Enzymreaktion bestimmt werden. In Abb. 35A (ganzer Temperaturbereich) bzw. Abb. 35B (linearer Bereich der Arrhenius-Darstellung) ist die halblogarithmische Darstellung der Umsatzgeschwindigkeit gegen die reziproke Temperatur dargestellt.

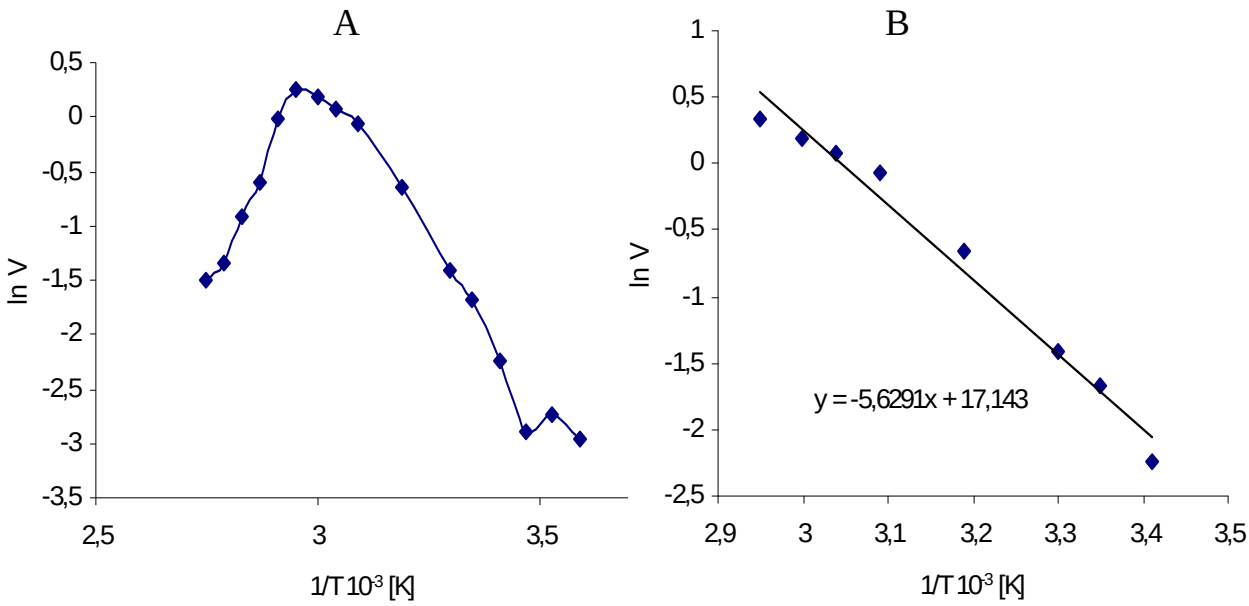

Abb. 35: A) Arrhenius Auftragung der Daten aus Abb. 34.
B) Ausschnitt aus dem linearen Bereich der Arrhenius Auftragung (A).

Die Aktivierungsenergie der Reaktion kann nach Formel von Arrhenius berechnet werden:

$$\ln k = \ln A - E_a/RT \qquad (1)$$

Hierbei ist der Ausdruck E_a/R die Steigung der Geraden, R ist die Gaskonstante ($R = 8{,}314\ J*mol^{-1}K^{-1}$) und *k* die Geschwindigkeitskonstante. Aus der Steigung der Geraden wurde die Aktivierungsenergie E_a der Enzymreaktion zu = 46,80 kJ/mol bestimmt.

3.3.4.2 *Paenibacillus sp.*

Für die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit bei der Protease aus *Paenibacillus sp.* wurde ähnlich vorgegangen wie bei der Protease aus *S. thermovulgaris*. Das Enzym wurde zusammen mit dem Substrat für 30 min bei 4-70°C vorinkubiert. Aus Abb. 36 geht hervor, dass die Aktivität im Temperaturbereich von 4 - 50°C stetig zunimmt. Bei 50°C war die maximale Aktivität erreicht, darüber erfolgte eine deutliche Abnahme der Aktivität.

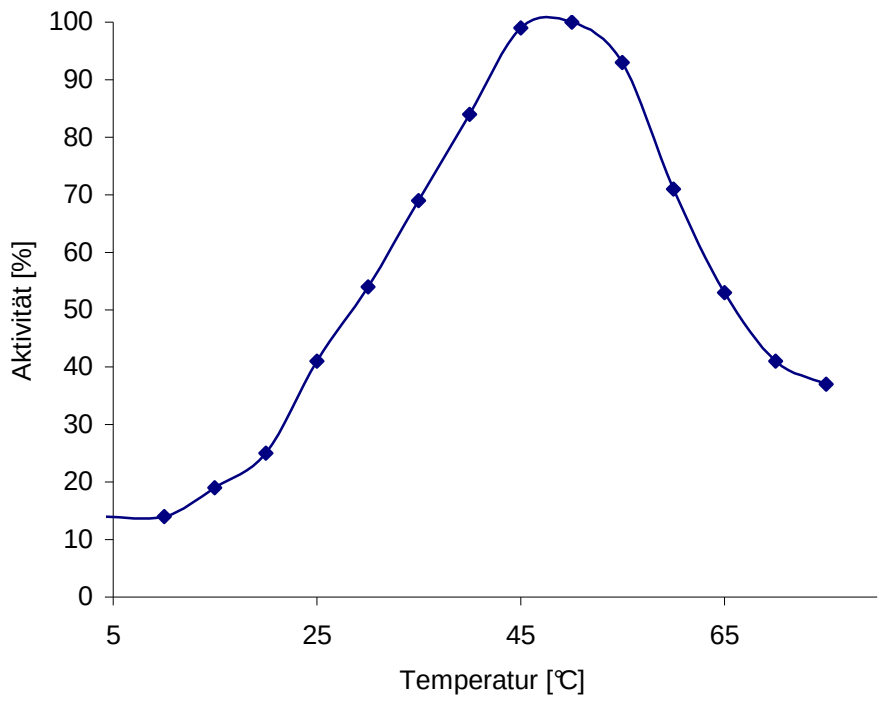

Abb. 36: Temperaturabhängigkeit der Protease aus *Paenibacillus sp.* Die Protease wurde bei den auf der Abszisse angegebenen Temperaturen für 1 h inkubiert und anschließend die Aktivität mit Azocasein bei 350 nm getestet.

Über die Auftragung nach Arrhenius (Abb. 37) wurde für die gereinigte Protease aus *Paenibacillus sp.* eine Aktivierungsenergie E_a von 45,38 J/mol bestimmt.

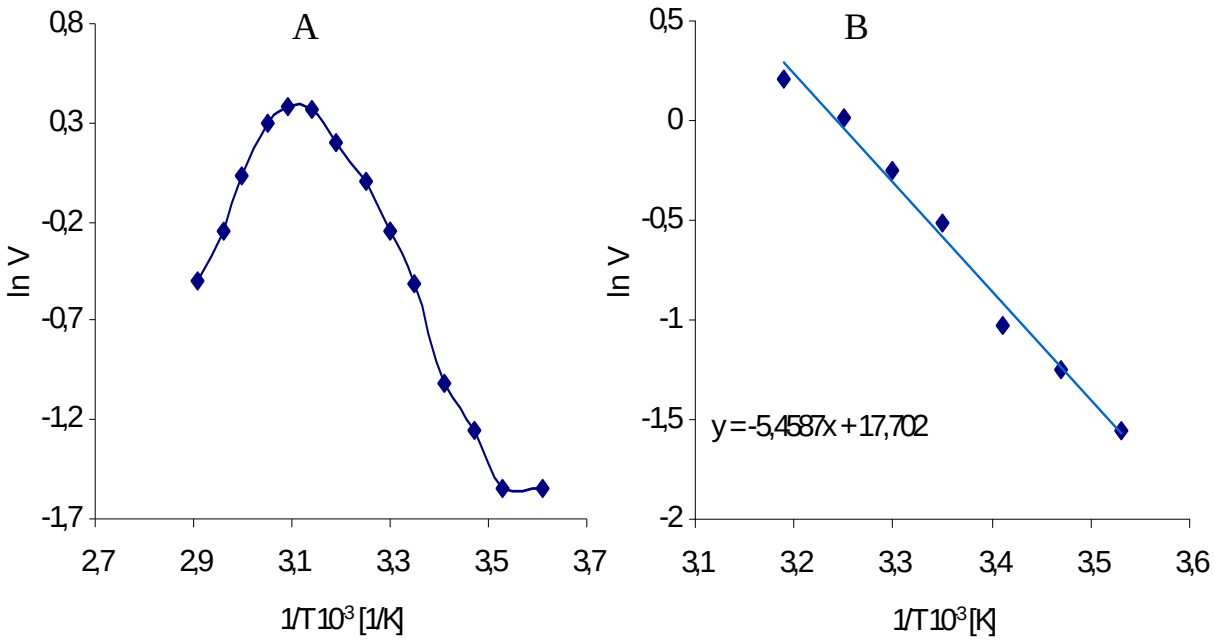

Abb. 37: **A)** Arrhenius Auftragung der Daten aus Abb. 36

B) Ausschnitt aus dem linearen Bereich der Arrhenius Auftragung (A).

3.3.5 Temperaturstabilität

Die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivitäten ergab für die Protease aus *S. thermovulgaris* einen Anstieg bis 65°C und für *Paenibacillus sp*. bis 50°C. Allerdings ergaben diese Versuche keinen Hinweis über die Stabilität der Enzyme bei den entsprechenden Temperaturen über längere Zeitdauer. Es wurden daher im folgenden die Enzyme bei verschiedenen Temperaturen vorinkubiert und zu bestimmten Zeitintervallen Proben entnommen und auf ihre Enzymaktivität getestet.

3.3.5.1 S. thermovulgaris

Vier verschiedenen Temperaturen wurden zur Vorinkubation dieser Protease gewählt. Die Temperaturen 35°C bzw. 55°C liegen im linearen Bereich des Arrhenius-Diagramms, d.h. in einem Bereich, wo irreversible Denaturierung noch nicht zu erwarten ist, 65°C entspricht dem Temperaturmaximum und bei 70°C erfolgte schon ein deutlicher Aktivitätsabfall, der auf eine irreversible Denaturierung hinweist (vgl. Abb. 36). In Zeitintervallen von 10 min wurden über einen Zeitraum von 70 min Proben entnommen und deren Aktivität durch den Azocasein-Test ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 38 dargestellt. Bei 35°C blieb die Enzymaktivität über den gesamten Messzeitraum stabil, während bei 55°C bereits eine schwache Abnahme zu verzeichnen war. Im Temperaturmaximum bei 65°C zeigte sich bereits eine klare Aktivitätsabnahme, innerhalb von 30 min bereits um zwei Drittel der ursprünglichen Aktivität. Bei der Inkubation bei 70°C war bereits nach 10 Minuten kaum noch Proteaseaktivität feststellbar.

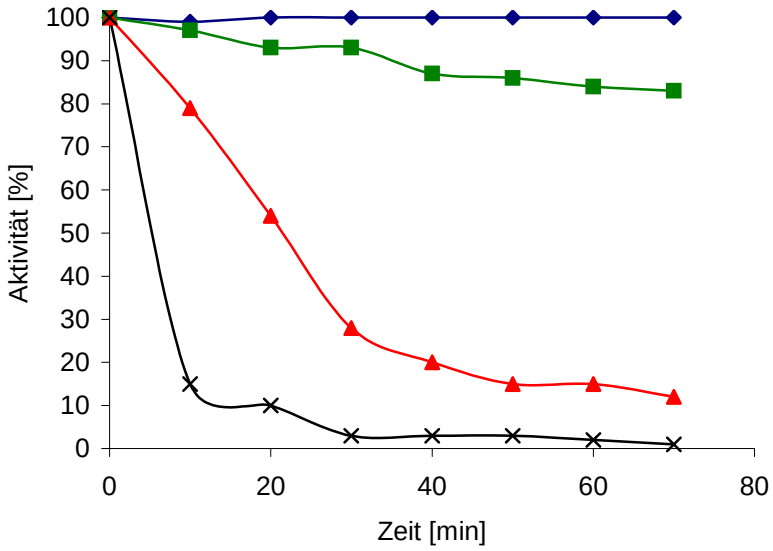

Abb. 38: Untersuchung der Temperaturstabilität der Protease aus *S. thermovulgaris* mit unterschiedlichen Inkubationszeiten bei 35°C (◆), 55°C (■), 65°C (▲) und 70°C (×). Die Proteaseaktivität wurde mit dem Azocaseintest bestimmt.

In Abb. 39 sind die Werte von 55°C und 65°C der Protease aus *S. thermovulgaris* in halblogarithmischer Form aufgetragen. Es ergibt sich eine lineare Abhängigkeit, die auf einen Inaktivierungsprozess erster Ordnung hinweist.

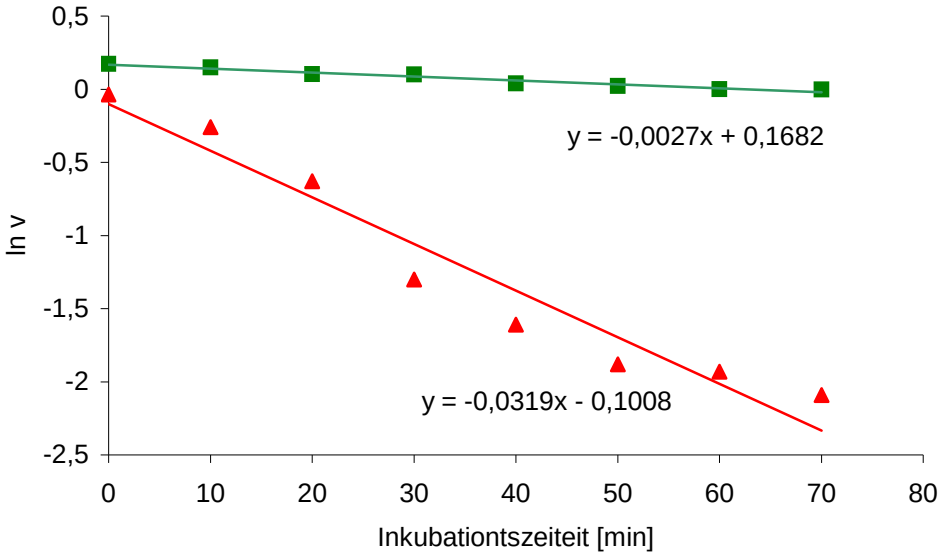

Abb. 39: Halblogarithmische Darstellung der Temperaturstabilität der Protease aus *S. thermovulgaris* bei 55°C (■) und 65°C (▲).

Aus den Steigungen der Geraden der halblogarithmischen Auftragung der Aktivitätswerte in Abb. 39 lassen sich die Denaturierungskonstanten $k_{denat,\ 65°C}$ = 0,0319 min^{-1} und $k_{denat,\ 55°C}$ = 0,0027 min^{-1} berechnen. Die dazugehörende Halbwertzeiten werden bestimmt nach der Beziehung:

$$\ln(N_t/N_0) = k_{denat} * t \quad (2)$$

N_t ist die Anzahl der Enzymmoleküle zum Zeitpunkt t, N_0 die Anzahl der Moleküle zu Beginn der Denaturierung. Nach Erreichen der Halbwertszeit liegt nur noch die Hälfte der Enzymmoleküle in aktiver Form vor (1/2 N_0) und es gilt:

$$\ln ½ = k_{denat} * t_{1/2} \quad (3)$$

Daraus ergibt sich für die Halbwertszeit:

$$t_{1/2} = 0{,}693 / k_{denat} \quad (4)$$

Es wurden die Halbwertzeiten $t_{1/2,\ 65°C}$ = 21,63 min und $t_{1/2,\ 55°C}$ = 4 h 27 min ermittelt.

3.3.5.2 *Paenibacillus sp.*

Um die Temperaturstabilität der Protease aus *Paenibacillus* sp. zu untersuchen, wurde das freie Enzym für insgesamt eine Stunde bei verschiedenen Temperaturen im Bereich des Aktivitätsanstieg bei 22°C, im Bereich des Maximums bei 48°C und im Bereich der Denaturierung bei 58°C vorinkubiert. Die Aktivitäten wurden mit dem Azocasein-Test bei 350 nm bestimmt. Wie aus Abb. 40 zu erkennen ist, bleibt die Aktivität der Protease bei 22°C für den Inkubationszeitraum von 1 h erhalten. Bei den höheren Temperaturen verlor die Protease jedoch schnell an Aktivität (Abb. 40).

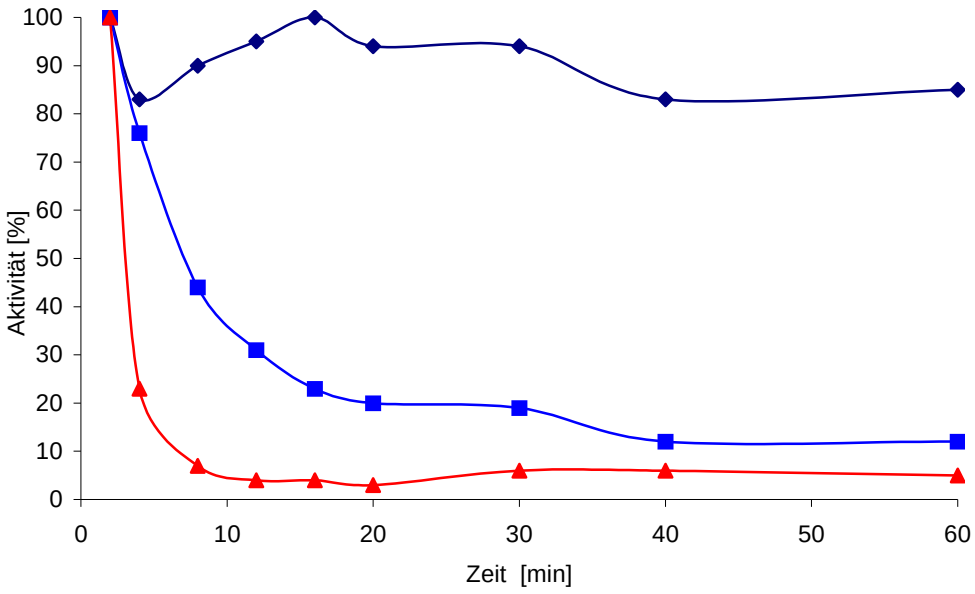

Abb. 40: Temperaturstabilität der Protease aus *Paenibacillus sp.* nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 22 °C (◆), 48°C (■) und 58°C (▲).

Aus der halblogarithmischen Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeiten gegen die Temperatur der Protease aus *Paenibacillus sp.* wurden die Denaturierungskonstanten $k_{denat,\ 48°C}$ = 0,049 min^{-1} und $k_{denat,\ 58°C}$ = 0,165 min^{-1} berechnet. Die entsprechenden Halbwertszeiten waren $t_{1/2,\ 48°C}$ = 14,1 min und $t_{1/2,\ 58°C}$ = 4,2 min.

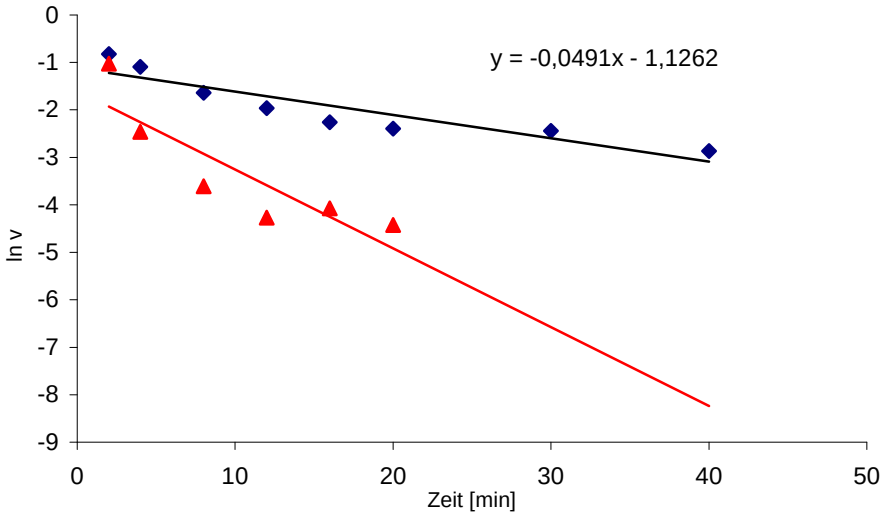

Abb. 41: Halblogarithmische Darstellung der Temperaturstabilität der Protease aus *Paenibacillus sp.* bei 48°C (◆) und 58°C (▲).

Die Ergebnisse der Bestimmung von Denaturierungskonstanten und Halbwertzeiten der isolierten Proteasen aus *S. thermovulgaris* und *Paenibacillus sp.* sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Denaturierungskonstante k_{denat} und Halbwertszeit $t_{½}$ der Proteasen aus *S. thermovulgaris* und *Paenibacillus sp.* bei Inkubationen bei verschiedenen Temperaturen.

Organismus	Temperatur [°C]	k_{denat} [1/min]	$t_{½}$ [min]
S. thermovulgaris	55	0,0027	256
	65	0,0319	21,63
Paenibacillus sp.	48	0,049	14,14
	58	0,165	4,22

3.4 Immunologische Untersuchungen

3.4.1 Produktion und Nachweis von Antikörper

Zur Unterstützung der Charakterisierung und der Zuordnung der neu isolierten Proteasen wurden spezifische polyklonale Antikörper gegen das Enzym aus *S. thermovulgaris* gewonnen. Von einer Lösung von 1 mg/ml des Antigens wurden 0.3 ml mit der gleichen Menge an Freund's Adjuvant mit Ultraschall zu einer stabilen Suspension verarbeitet. Diese Suspension wurde subkutan an verschiedenen Stellen unter die Rückenhaut eines Kaninchens appliziert. Über einen Zeitraum von 8 Wochen folgten 3 weitere Injektionen mit jeweils 0,4 ml Antigenlösung ohne Freund's Adjuvant. Die Aktivität der Antikörper wurde mit dem Doppeldiffusionstest nach Ouchertlony und mit der Methode der Immunpräzipitation überprüft.

3.4.1.1 Immunodiffusion nach Ouchterlony

In eine Agarose-Platte vom Durchmesser 3,5 cm wurden eine zentrale Vertiefung und in gleichen Abständen 6 periphere Vertiefungen vom Durchmesser 0,4 cm ausgestanzt. In die mittlere Vertiefung wurden 20µl des Antigens (0,7 mg) und in die peripheren Vertiefungen 20 µl Antiserum in den in Abb. 42 angegebenen Verdünnungen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von drei Tagen bei 4°C wurden weiße Präzipitationslinien zwischen der zentralen und den peripheren Vertiefungen sichtbar, die je nach Konzentration unterschiedlich stark ausgeprägt waren. Damit konnte die Bildung spezifischer Antikörper gegen die Protease aus *S. thermovulgaris* nachgewiesen werden.

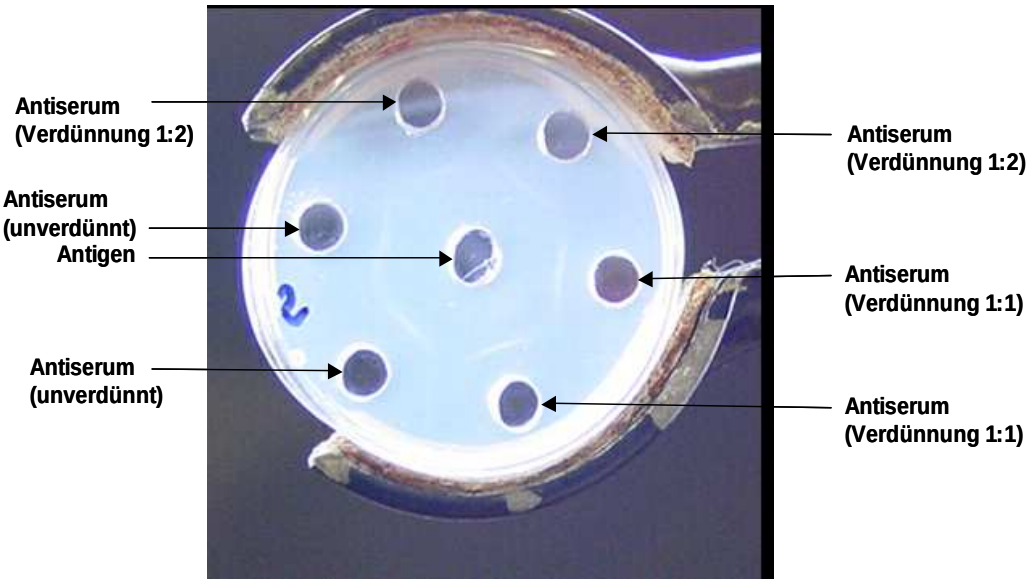

Abb. 42: Ouchterlony-Test der Reaktion der gereinigten Protease aus *S. thermovulgaris* gegen das gegen dieses Protein induzierte polyclonale Antiserum aus Kaninchen. Das Antiserum hatte einen Proteingehalt von 0,12 mg/ml. In die Vertiefungen wurden je 20 µl der angegebenen Lösungen pipettiert, die Verdünnungen wurden mit 0,05 M Kaliumphosphat pH 7,5 hergestellt. Die Platte wurde für drei Tage bei 4°C inkubiert.

3.4.1.2 Immunopräzipitation der Antigenlösung (Präzipitin-Reaktion)

Der Nachweis der spezifischen Antikörper gegen die gereinigte Protease aus *S. thermovulgaris* im Serum erfolgte in einen zweiten Test über die Antigen-Antikörperreaktion in Lösung, auch Präzipitin-Reaktion genannt. Durch die spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion in Lösung kommt es zur Abnahme der Aktivität.

Eine konstante Menge des isolierten Enzyms (150 µl, 76 µg) wurde für 1 h mit verschiedenen Mengen von Antiserum im Bereich 0-10 µl inkubiert. Zur Abtrennung eines möglichen Antigen-Antikörper-Präzipitats wurde die Mischung anschließend abzentrifugiert. Danach wurde im Überstand die Enzymaktivität über den Azocaseintest bestimmt. Wie in Abb. 37 zu erkennen, nimmt die Aktivität im Überstand mit zunehmender Antikörpermenge ab. Dies ist ein weiterer Beweis für die

Spezifität des Antikörpers gegen die Protease aus *S. thermovulgaris*.

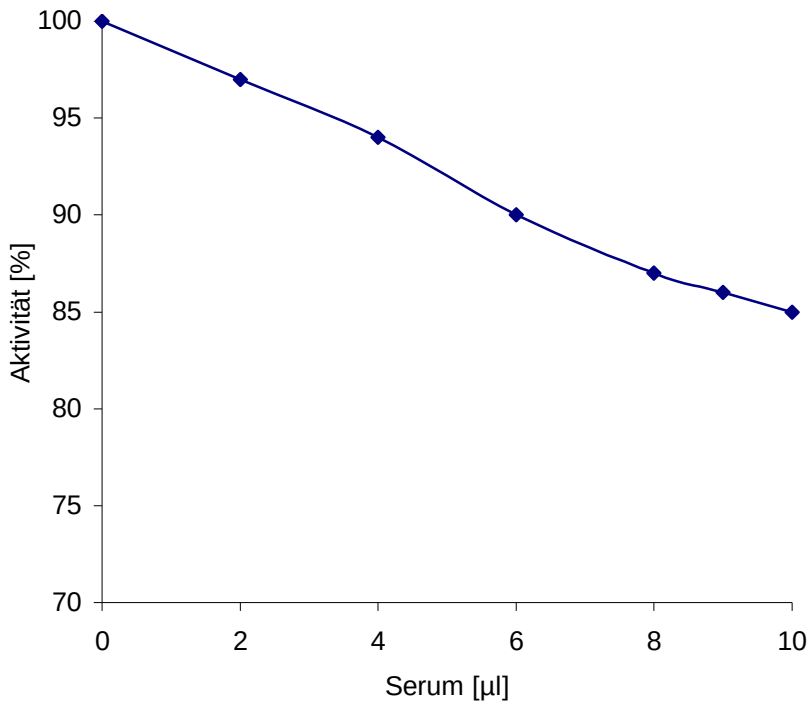

Abb. 43: Präzipitin-Reaktion der Protease aus *S. thermovulgaris* mit Kaninchen-Serum. Eine konstante Menge an gereinigter Protease aus *S. thermovulgaris* wurde mit den auf der Abszisse angegebenen Mengen des gegen das Enzym induzierte Antikörpers gegeben, für 1 h inkubiert bei 22°C und danach bei 11000 U/min für 5 min abzentrifugiert. Die Proteaseaktivität wurde mit dem Azocaseintest im Überstand gemessen.

3.4.2 Reinigung der Antikörper aus den Serum

Zur Gewinnung der IgG-Fraktion des gegen die Protease aus *S. thermovulgaris* gerichteten Antiserums wurde dieses einer Ammoniumsulfatfällung unterzogen, um Serumalbumin und die Lipidkomponenten abzutrennen. Dadurch verringerte sich der Proteingehalt im Serum um über 80 %. Danach wurde das Präzipitat in 6 ml 0,05M Tris-HCl pH 8 gelöst und dreimal gegen je 500 ml 0,05 M Tris-HCl pH 8 dialysiert. Anschließend wurde das Dialysat auf einer DEAE-Cellulose-Säule aufgetragen und unter Verwendung eines 0-0,3 M NaCl-Gradienten aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden bei einer Absorption von 280 nm vermessen.

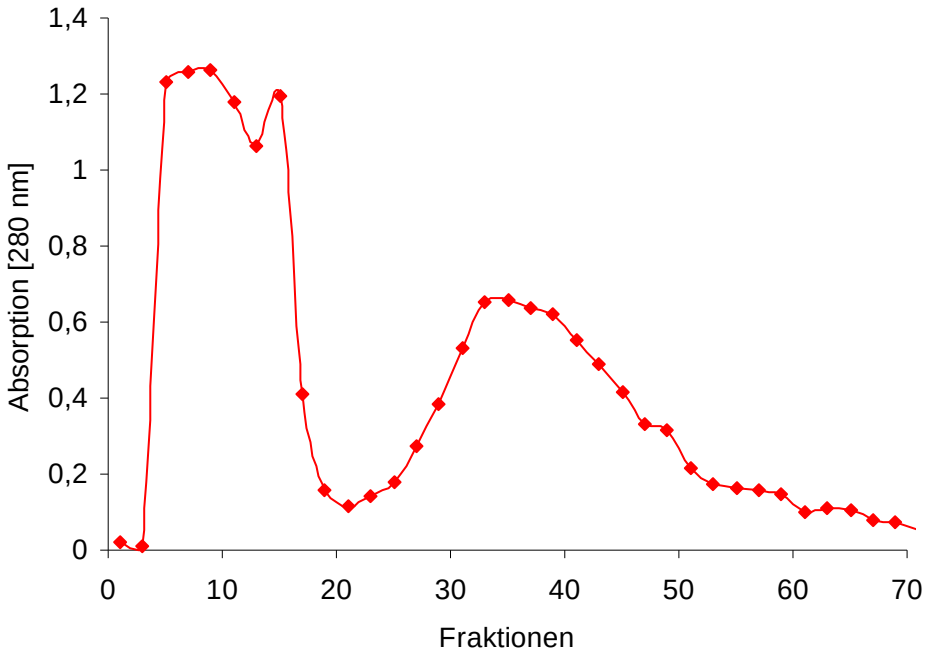

Abb. 44: Ergebnisse der Anionenaustauscher-Chromatographie des Antiserums gegen die Protease aus *S. thermovulgaris* nach Ammoniumsulfatfällung. Auf die mit 0,05 M Tris-HCl pH 7,5 äquilibrierte DEAE-Cellulose-Säule (Länge 20 cm; Ø: 2 cm) wurden 6 ml des dialysierten Ammoniumsulfatnieder-schlags mit einem Proteingehalt von 30 mg aufgetragen. Es wurde bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min mit 200 ml eines Gradienten von 0-0,3 M NaCl Gradienten in 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5 eluiert. 70 Fraktionen zu je 3 ml wurden gesammelt. Die Detektion der Immunoglobulinfraktion erfolgte über die Absorption bei 280 nm.

Die Ergebnisse der Anionenaustauscher-Chromatographie sind in Abb. 44 dargestellt. Es sind deutlich zwei Proteinmaxima zu erkennen, das erste von Fraktion 5-15 und das zweite Maximum von Fraktion 31-40.

Zusätzlich zur UV-Absorptionsmessung bei 280 nm wurde eine Proteinbestimmung nach der Methode von Bradford (1976) von den einzelnen Reinigungsschritten bei der Antikörperreinigung durchgeführt. In Tabelle 9 sind die Proteinwerte der einzelnen Reinigungsschritte der Antikörper der IgG Klasse aus dem Kaninchenserum aufgelistet.

Tabelle 9: Reinigungsverlauf der IgG-Fraktion aus Kaninchenserum. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (1976).

Reinigunsschritte	Serum vor Ammonium-sulfatfällung	Kulturfiltrat nach Ammonium-sulfatfällung	Eluat der DEAE-Cellulose
Volumen [ml]	20	14	7
Protein [mg/ml)	35,54	16,39	7,21
Geamtprotein [mg]	710	229,50	50,53

3.4.3 SDS-Gelelektrophorese

Die Reinheitsüberprüfung der Immunoglobulinfraktionen erfolgte mit Hilfe der SDS-PAGE. Diese Methode ist besonders gut geeignet, um das im Serum dominierende Immunoglobulin vom IgG-Typ zu trennen. Bei diesem Immunoglobulin handelt es sich um ein Heterodimer, bestehend aus je zwei identischen leichten und schweren Ketten, die über ihre Molmassen mittels SDS-PAGE bestimmt werden können. Die getrennten Banden wurden mittels Coomassie-Brillantblau (s. Abb. 45 links) bzw. Silber-Färbung (s. Abb. 45 rechts) sichtbar gemacht. Zur Größenbestimmung der einzelnen Banden wurde ein Proteinstandard (a) eingesetzt. In die Geltaschen (b) und (c) wurden 2-10 µl der Fraktionen 10-12 nach Anionenaustauscherchromatographie aufgetragen.

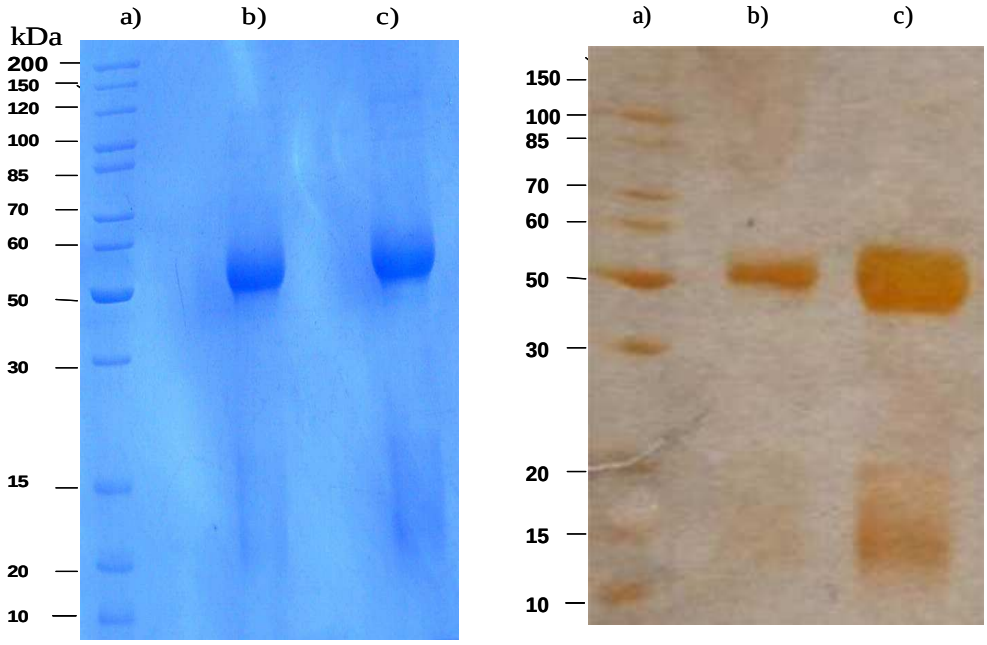

Abb. 45: Elektrophoretische Auftrennung der isolierten Immunoglobulinfraktion in einem 10%-igen SDS-Gel. Das linke Gel wurde mit Coomassie-Brillantblau gefärbt, das rechte mit Silbernitrat. In beiden Gelen enthält die Spur a) 5 µl Proteinstandard (molekulare Massen nach Herstellerangaben links vermerkt); b) Fraktion 10-12; links 5 µl, 8,3 µg, rechts 2 µl, 3,3 µg; c) Fraktion 10-12, links10 µl 16,6 µg, rechts 5 µl,8.3 µg.

Im Vergleich zur Immunoglobulinfraktion nach Ammonuimsulfatfällung konnte ein deutlicher Reinigungseffekt erzielt werden. Die erste breite Bande bei ~60 kDa kann der schweren Kette des Immunoglobulins zugeordnet werden. Die zweite Bande bei ~20 kDa in dem mit Silbernitrat gefärbten Gel ist sehr schwach und entspricht der leichten Kette des Immunoglobulins. Mittels Anionenaustauscher konnte somit der reine Antikörper gegen die Protease aus *S. thermovulgaris* aus dem Kaninchenserum gewonnen werden.

3.4.4 Verwandtschaftsuntersuchungen mit anderen Proteasen

Um die Verwandtschaftsbeziehung der Proteasen Trypsin (50 µg/ml), Thermolysin (50 µg /ml), Pronase (50 µg/ml), der isolierten Protease aus *Paenibacillus sp* sowie der Protease aus *S. thermovulgaris* zu der isolierten Immunoglobulinfraktion zu untersuchen, wurde eine Antigen-Antikörperreaktion in Lösung durchgeführt. Hierfür wurden jeweils 150 µl der oben genannten Proteasen mit 0-10 µl der Immunoglobulinfraktion versetzt und eine Stunde bei 22°C vorinkubiert. Danach wurden Proben entnommen und die Aktivität mit dem Azocaseintest bestimmt.

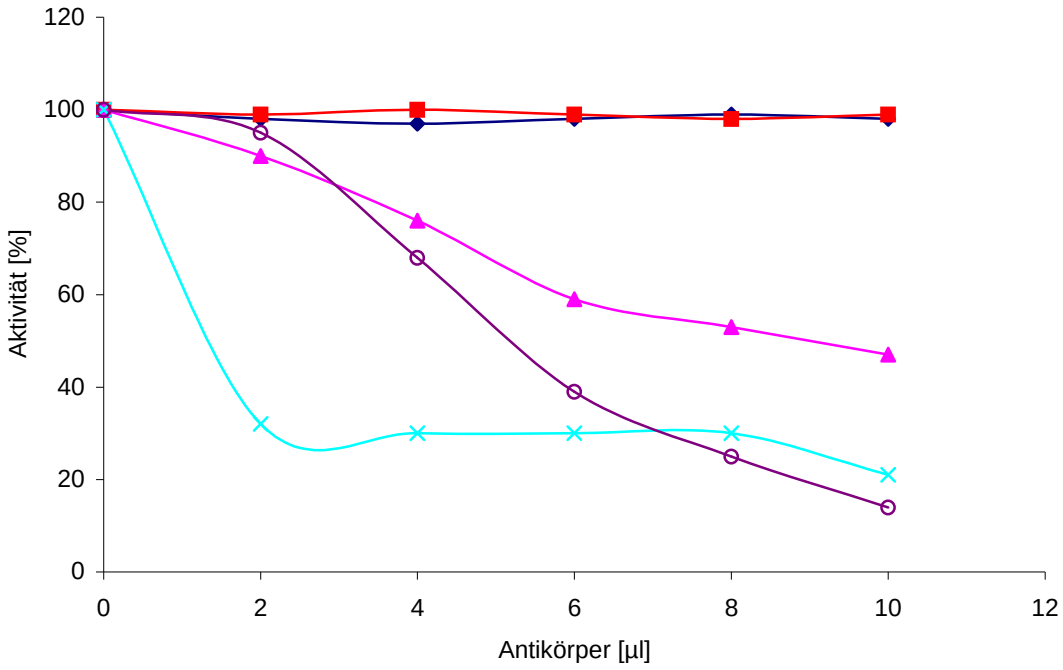

Abb. 46: Kreuzreaktion verschiedener Proteasen mit der gegen die Protease aus *S. thermovulgaris* gerichteten Immunoglobulinfraktion aus Kaninchen. Es wurden jeweils 150 µl Trypsin (50µg/ml)(◆), Thermolysin (50 µg/ml) (■), Pronase (○), Protease aus *Paenibacillus sp.*(25 µg) (▲) und *S. thermovulgaris* (30 µg) (×) vorgelegt und Immunoglobulinfraktion in den angegebenen Mengen versetzt. Nach 1 h Inkubation bei 22°C wurde die Aktivität mit Azocasein bestimmt.

Wie aus Abb. 46 zu erkennen ist, nimmt die Aktivität der Protease aus *S. thermovulgaris* und *Paenibacillus sp.* mit steigenden Volumina des Antikörpers ab. Bereits nach einer Zugabe von 2 µl Antikörper verliert das Enzym aus *S. thermovulgaris* über 80% der Aktivität, was auf das Vorliegen von spezifischen Antiköpern gegen die Protease aus *S. thermovulgaris* hindeutet. Ebenfalls beobachtet man einen Abfall auf 50%-Aktivität nach Zugabe von 8 µl bei der Protease aus *Paenibacillus sp.* Die Ergebnisse deuten folglich darauf hin, dass zwischen der Protease aus *S. thermovulgaris* und *Paenibacillus sp*. sowie bei der Pronase Verwandtschaftsbeziehungen vorliegen, während mit Trypsin und Thermolysin die Aktivität trotz Zugabe des Antikörpers unverändert blieb.

3.5 Immobilisierung der Protease aus *S. thermovulgaris* und *Paenibacillus sp.* an Trägermaterial

Enzyme in ihrer ursprünglichen löslichen Form sind für industrielle und medizinische Applikationen wenig anwendbar, da sie in technischen Prozessen nicht zurückgewonnen werden können und somit ein beträchtlichen Kostenfaktor darstellen. Um dies zu verhindern wird versucht, Enzyme an feste Trägermaterial zu fixieren, so dass sie in Reaktionsprozessen zurückgehalten und wiederholt eingesetzt werden können (White & Kennedy, 1980). Da die Isolierung der Proteasen aus *S. thermovulgaris* und *Paenibacillus sp.* besonders in Hinblick auf eine technische Nutzung erfolgte, wurde auch für sie ein geeignetes Immobilisierungsverfahren erprobt. Für die Proteasen Trypsin und Thermolysin wurde bereits ein effizientes Verfahren zur Kopplung an synthetische polymere Vliesstoffe entwickelt (Nouaimi *et al.* 2001)

Ein besonderes Prinzip war dabei die Verwendung von BSA als Spacer zwischen der Matrixoberfläche und dem Enzym. Insbesondere bei Verwendung von Polyester hat die Vliesoberfläche einen stark hydrophoben Charakter, der die an hydrophile Umgebung angepassten Enzymstrukturen destabilisiert. Durch Zwischenschaltung von BSA konnte in dem genannten Verfahren die Stabilität des Enzyms über lange Zeit erhalten werden, auch stieg die Resistenz gegenüber extremen Temperatur-, pH- und Lösungsmitteleinflüssen. Daher wurden dieses Verfahren der Kopplung des Enzyms über einen BSA-Spacer an Polyester-Vlies FO 2143 für die neu isolierten Proteasen getestet. Als Vergleich erfolgte parallel dazu die Immobilisierung von Trypsin mit der gleichen Methode. Die Immobilisierung erfolgte nach der Methode von Nouaimi (2003) durch Kopplung von BSA an die, nach partieller saurer Hydrolyse, freigesetzten Carboxylgruppen des Trägermaterials. Hierfür wurden 20 Polyester-Vliese definierter Größe (1x1 cm) vorbereitet und 1 h bei50°C mit 100 ml 3,65 N HCl hydrolysiert. Danach wurden die Vliesstücke mit Hilfe einer Fritte unter Vakuum mehrmals mit H_2O gewaschen. Als nächster Schritt wurden die Vliese 30 min mit 45 ml Dioxan geschüttelt und anschließend zweimal mit Dioxan in einer Fritte unter Vakuum gewaschen.

Für die Aktivierung der Polyester-Vliese wurde in einem Becherglas 5 ml Dioxan vorgelegt und nachfolgend die hydrolysierten Vliese sowie 0,206 g Dicyclohexylcarbodiimid und 0,114 g N-Hydroxysuccinimid zugegeben (Cutrecasas, 1972). Die Lösung wurde 70 min auf einen Schüttler bei RT inkubiert. Die aktivierten Vliese wurden der Lösung entnommen und zuerst 15 min mit 45 ml Dioxan, dann 10 min mit 25 ml Methanol gewaschen. Die Polyester-Vliese wurden abschließend nochmals 5 min mit Dioxan in einer Fritte unter Vakuum gewaschen.

Für die Anbindung des Spacers wurden die Polyester-Vliese zuerst in 5 ml einer eiskalten 1%-igen BSA-Lösung in 0,1 M Kaliumphosphat pH 7,5 über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Vliese mit 200 ml 0,1 M Kaliumphosphat pH 7,5 / 0,5 M NaCl-Lösung über einer Fritte gewaschen und in 0,1 M Kaliumphosphat pH 7,5 überführt.

Um das Enzym an die BSA-gebundenen Polyester-Vliese zu immobilisieren, wurden die Vliese für 30 min in 20 ml 0,25 M Boratpuffer pH 8,5 und 5 ml 25%ige Glutardialdehyd geschüttelt und anschließend mit einer Lösung 0,1 M Kaliumphosphat / 0,5 M NaCl pH 7,5 über einer Fritte gewaschen. Schließlich wurden die Polyester-Vliese mit 1,12 mg in 1 ml einer Lösung der Protease aus *S. thermovulgaris* bzw. 1,28 mg in 1 ml der Protease aus *Paenibacillus sp.* in einer Petrischale überschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Vliese mit 200 ml 0,1 M Kaliumphosphat pH 7,5 / 0,5 M NaCl über einer Fritte gewaschen und schließlich in 0,1 M Kaliumphosphat pH 7,5 überführt.

3.5.1 Aktivitätsmessung und Proteinbestimmung der immobilisierten Proteasen

Die Aktivitäten der immobilisierten Proteasen aus *Paenibacillus sp.* und *S. thermovolgaris* wurden, im Vergleich zum immobilisierten Trypsin über den Azocaseintest bei 350 nm getestet. Zur Überprüfung der Menge an gebundenen Enzym auf dem Polyester-Vlies wurde eine Proteinbestimmung nach der BCA-

Methode durchgeführt (Smith *et al*., 1985) und die Absorption bei 562 nm gemessen. Die Ergebnisse der Aktivitätsmessung und der Proteinbestimmung der immobilisierten Vliese sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse der Aktivitäten und Proteingehalte der Proteasen nach Kopplung an Polyester-Vlies. Der Azocasein- und BCA-Test wurde jeweils an einem 1 cm^2 Vliesstück durchgeführt.

Immobilisierte Proteasen	**Proteaseaktivität (△E/cm^2)**	**Proteingehalt (mg/cm^2 Vlies)**
Ohne Protease	0	0
Protease aus *Paenibacillus sp*.	0,124	0,075
Protease aus *S. thermovulgaris*	0,197	0,07
Trypsin-Vlies	0,812	0,248

Die beiden neu isolierten Proteasen zeigten nach der Immobiliserungsprozedur zwar Enzymaktivitäten in vergleichbarer Größenordnung, allerdings deutlich weniger als das zum Vergleich eingesetzte Trypsin. Dem entsprechen auch die deutlich geringeren Proteinwerte. Die geringeren Ausbeuten können darauf zurück zu führen sein, dass die Immobilisierungsmethode für Trypsin optimiert wurde.

3.5.2 Abbau von Gelatine

Ein weiterer, der praktischen Anwendung angepasster Test der Aktivität der immobilisierten Proteasen aus *S. thermovulgaris* und *Paenibacillus sp.* erfolgte durch Auflegen feuchter immobilisierter Polyester-Vliese auf eine Gelatineschicht in einer Petrischale. Die Gelatine fungiert hierbei als Substrat für die Protease. Die Petrischalen wurden über Nacht bei 30°C inkubiert und danach das Vlies entfernt. Es zeigte sich für beide Proteasen eine deutliche Verflüssigungszone genau im Bereich des zuvor aufgelegten Vlieses als Hinweis der proteolytischen Aktivität (Abb. 47).

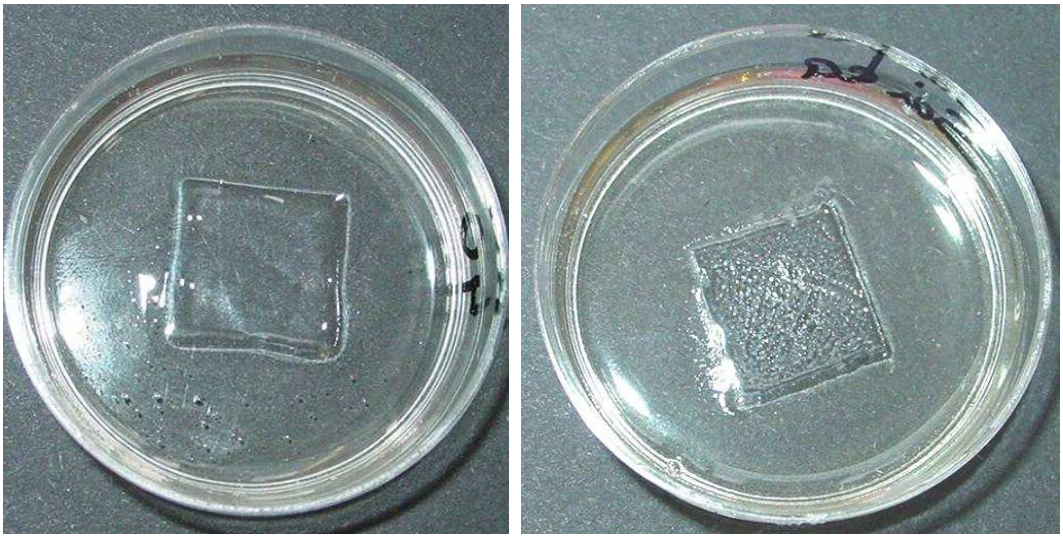

Abb. 47: Abbau von fester Gelatine durch die auf Polyester-Vlies immobilisierten Protease. Die immobilisierten Vliese (1x1 cm^2) wurden über Nacht auf Gelatineplatten mit einem Durchmesser von 3,5 cm aufgelegt. Nach Inkubation für 16 h bei 30°C wurden die Vliese entfernt. Linke Petrischale: Protease aus *Paenibacillus sp;* rechte Petrischale: Protease aus *S. thermovulgaris*.

Abb. 48: Gelatin Platte mit immobilisierten BSA-Vlies (Kontrollplatte ohne Enzym).

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Gewinnung von Enzymen, die für technische Anwendungen geeignet sind. Insbesondere Proteasen spielen bei biotechnologischen Anwendungen eine Schlüsselrolle, da diese ohne den Einsatz von Cofaktoren verwendet werden können. Für den Einsatz von Proteasen für kommerzielle Zwecke ist jedoch eine einfache und kostengünstige Zugänglichkeit der isolierten und gereinigten Proteasen unabdingbar.

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit speziell nach extrazellulären Proteasen gesucht. Die Bakterienstämme, die für diese Arbeit zur Anwendung kamen, wurden beide aus Bodenproben in Nigeria isoliert. Von der deutschen Sammlung für Mikroorganismen (DSMZ) wurden sie als *S. thermovulgaris* und *Paenibacillus sp* identifiziert.

4.1 Extrazelluläre Proteasen aus *S. thermovulgaris* und *Paenibacillus sp*.

Streptomyceten sind aufgrund ihrer Produktion von Antibiotika und Exoenzyme (Sanglier *et al*, 1993) für den technischen Gebrauch interessant. Aus dieser Klasse von Mikroorganismen wurden bereits zahlreiche Proteasen isoliert, wie beispielsweise die Pronase aus *Streptomyces griseus*, eine alkalische extrazelluläre Serinprotease (Sidhu et al 1994). Aus *Streptomyces pactum* wurde eine Kreatinase mit einem Temperaturmaximum von 65°C und einem pH-Optimum von pH = 8 gewonnen (Böckle *et al* 1995). 2001 wurde aus *Streptomyces thermovulgaris* eine Glucose-Isomerase isoliert. Dieses Enzym hatte ein pH-Optimum zwischen 7-8. Petinate et al. (1999) kultivierten den aus brasilianischen Bodenproben stammenden Bakterienstamm *Streptomyces cyaneus* neun Tage lang, um daraus eine extrazelluläre Serinprotease zu isolieren.

Die Kultivierungsdauer von *S. thermovulgaris* wurde auf 96 h beschränkt, da nach dieser Zeit Proteaseaktivität im Medium nachgewiesen wurde, und bei längeren Inkubationszeiten keine Sterilität mehr gewährleistet werden konnte. Mit seiner Wachstumstemperatur von 50°C gehört der Stamm zu den thermophilen Streptomyceten, einer Minderheit dieser Gattung, an. Bei dieser Temperatur wuchsen die Zellen gut an.

Ein besonders kritischer Parameter bei der Zellkultivierung von *S. thermovulgaris* war die Einhaltung eines konstanten pH-Wertes. Während des Zellwachstums sank der pH-Wert des Medium auf ein pH von 3. Da in einem sauren Medium die Sekretion von Proteasen verhindert wird, war eine Kultivierung in Schikanekolben ohne pH-Kontrolle unmöglich. Daher wurde die Zellzüchtung unter Vorlage der Nährlösungen in einem 20 L Fermenter durchgeführt, wobei der pH-Wert während der Fermentation ständig nachjustiert wurde, um während der gesamten Fermentationszeit von 96 h ein konstanter pH-Wert von 7,2 zu gewährleisten.

Die extrazelluläre Protease wurde über zwei Reinigungsschritte, einer Ammoniumsulfatfällung und einer Kationenaustauscherchromatographie aus dem Kulturmedium in reiner Form gewonnen. Dazu musste die Protease nur 5-fach angereichert werden, ein Vorteil der Isolierung aus den Kulturmedium. Die Reinheit wurde durch verschiedene elektrophoretische Methoden (SDS-PAGE, Zymographie, 2D- und native Elektrophorese) bestätigt.

So konnte für die Protease aus *S. thermovulgaris* eine schnelle und effektive Reinigung etabliert werden, während in der Literatur häufig aufwendige mehrstufige Reinigungen mittels Ionenaustausch-, Gelfiltrations-Chromatographie, HPLC und FPLC von Proteasen aus *Streptomyces spp.* beschrieben sind (Bressollier *et al.*, 1999).

Der zweite in dieser Arbeit untersuchte Stamm *Paenibacillus sp.* mit einer Wachstumstemperatur von 30°C gehört den mesophilen Bakterienstämmen an und wird den *Bacilleacea* zugeordnet. Auch dieser Stamm ist für seine Proteasebildung bekannt. Aus *Paenibacillus sp.* wurde von Moneke *et al.* (1998) eine thermophile Xylose-Isomerase aus den Kulturüberstand isoliert. Das Enzym hatte ein Temperaturmaximum bei 60°C und ein pH-Optimum zwischen 6,5 und 7,0.

Die Kultivierung von *Paenibacillus sp.* erfolgte nach Chou *et al.* (1976) und war nach 72 h beendet. Auch hier gelang es, eine extrazelluläre Protease nach zwei Reinigungsschritten in reiner Form zu bekommen mit einer Ausbeute von 75 % und einer 1,7-fache Anreicherung. Die Reinheit der Protease wurde mit Hilfe elektrophoretischer Methoden überprüft, so zeigten die Untersuchungen mit der 2D-Elektrophorese nur einen Proteinfleck auf dem Gel.

4.2 Stabilität der isolierten Proteasen

Enzyme reagieren sehr sensible gegenüber äußeren Einflüssen, wie Temperatur, pH-Wert und Polarität, innerhalb engeren Grenzen durch reversible Aktivitäts-veränderungen, bei größeren Abweichungen solcher Umweltparameter kann es zu irreversiblen Veränderungen und zu Denaturierung des Enzyms kommen. Dies gilt besonders für industrielle Prozesse, wo solche Veränderungen nicht immer auszuschließen sind und die Enzyme daher eine höhere Stabilität aufweisen sollten.

Die Aktivitäten in Abhängigkeit der Temperatur, welche eine Schlüsselrolle in vielen biotechnologische Anwendung hat, sollten Aufschluss über die Temperaturstabilität der isolierten Proteasen aus *S. thermovulgaris* und *Paenibacillus sp*. geben. Für die Denaturierungskinetik wurden somit die angereicherten Enzymen nach den jeweiligen Reinigungsschritte aus beiden Mikroorganismen benutzt.

In manchen Spezies wie, *Streptomyces exfoliatus* und *Streptomyces albidoflavus* variiert das Temperaturmaximum von Protease von 35°C zu 45°C, bei *Streptomyces fradiae* dagegen ist die Protease am aktivsten bei 50°C und in *Streptomyces moderatus* ist das Optimum zwischen 50°C und 60°C (Chandrasekaran & Dhar, 1987; Yeoman & Edwards, 1997). Serinproteasen aus *S. thermovulgaris* und *S. pactum* sind aktiv in einem breiten Temperaturbereich zwischen 20°-60°C beziehungsweise 40°-75°C (Böckle *et al.*, 1995).

Die Protease aus *S. thermovulgaris* hatte bei einer Temperatur von 55°C eine Halbwertzeit von 4h 27 min, bei 65°C verlor das Enzym 80% seiner Aktivität. Das Temperaturmaximum lag bei 65°C und der pH-Optimum lag im Bereich von 9-10.

Die Protease aus *Paenibacilus sp*. hatte dagegen eine Halbwertzeit von 14 min bei 48°C. Die Protease war am aktivsten bei einer Temperatur von 45°C und einem pH von 8-9. Das Temperaturoptimum ist bei dieser Potease deutlich niedriger als das der aus dem gleichen Stamm isolierte Xylose-Isomerase.

4.2.1 Größenbestimmung der isolierten Proteasen

Eine Methode zur Bestimmung der molekularen Masse der isolierten Protease aus *S. thermovulgaris* ist die Gelfiltrationchromatographie mit Sephacryl S-200. Bei dieser Methode wird die Masse des nativen Proteins mit Hilfe verschiedener Eich-Substanzen bekannter Molmasse bestimmt und ist somit Ergänzung der SDS-PAGE. Es konnte für die isolierte Protease aus *S. thermovulgaris* eine molekulare Masse von 28 kDa

bestimmt werden. Der ermittelte Wert aus der SDS-PAGE lag bei 24 kDa. Die über beide Methoden bestimmte Molmasse und die einzelne Bande auf das SDS-Gel deuten darauf hin, dass die Protease keine Untereinheiten besitzt und es ein monomeres Protein ist. Die Diskrepanz in der Molmassenbstimmung beider Methoden liegt bei der relativen Ungenauigkeit insbesondere der Gelfiltration im Fehlerbereich, auch hat bei dieser Methode die Molekülform einen wesentlichen Einfluss.

Das Ergebnis der Molmassenbestimmung über die SDS-PAGE für die Protease aus *S. thermovulgaris* lag in der Größenordnung der bisher isolierten Serinproteasen aus Streptomyceten (22-30 kDa) (Renko *et al.,* 1989, Muro *et al.,* 1989).

1997 isolierte Yeoman *et al.* eine Protease aus *S. thermovulgaris.* Die Molmasse wurde über die SDS-PAGE auf 30 kDa ermittelt. Die Bestimmung über die Gelfiltrationschromatographie-Analyse ergab dagegen eine Molmasse von 120 kDa, was darauf hindeutet, dass es sich bei der isolierten Protease vermutlich um ein Tetramer handelt.

Die Bestimmung der nativen Molmasse der Protease aus *Paenibacillus sp.* über die Gelfiltrationschromatographie ergab eine molekulare Masse von 14,45 kDa. Die Molbestimmung über die SDS-PAGE ergab 18 kDa. Bei dieser isolierten Protease handelt es sich also vermutlich um ein Monomer.

4.3 Untersuchung der Spezifität der isolierten Proteasen

Bisher wurden die isolierten Serinproteasen aus *Streptomyces sp.* als chymotrypsin-, trypsin- und subtilisinähnliche Enzyme charakterisiert (Sidhu *et al.*, 1994). Im Rahmen der Charakterisierung wurden auch die in dieser Arbeit isolierten Proteasen hinsichtlich ihrer Spezifität gegenüber verschiedenen synthetischen Substraten und Hemmstoffen untersucht.

4.3.1 Substratspezifität

Um die Spezifität der zu untersuchenden Protease genau bestimmen zu können, wurden neben dem unspezifischen Azocaseintest synthetische Substrate mit klar definierten Peptidbindungen eingesetzt. Die Untersuchungen zur Spezifität der isolierten Proteasen aus *S. thermovulgaris* und *Paenibacillus sp.* wiesen darauf hin, dass chymotrypsinähnliche Aktivitäten vorlagen. So zeigte die isolierte Protease aus *S. thermovulgaris* mit den spezifischen Chymotrypsin-Substraten N-Succinyl-L-phenylalanin-p-nitroanilid, Benzoyltyrosin-p-nitroanilid und N-Benzoyl-L-tyrosinethylester eine Umsetzung, während mit dem spezifischen Substrat N-Benzoyl-L-arginin-p-nitroanilid zur Detektion von trypsin-ähnlichen Aktivitäten die isolierte Protease keinerlei Reaktion aufwies. Dies bestätigt die bevorzugte Hydrolyse der Säureamidbindung unter Beteiligung aromatischer Aminosäurereste. Aus den Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die Protease aus *S. thermovulgaris* nach den aromatischen Aminosäureresten Phenylalanin und Tyrosin spaltet.

Die Untersuchung mit der isolierten Protease aus *Paenibacillus sp.* zeigte, dass das Enzym bevorzugt nach Tyrosinresten spaltet, während mit den Substraten N-Succinyl-L-phenylalanin-p-nitroanilid und Benzoyltyrosin-p-nitroanilid kein eindeutiges Resultat erzielt werden konnte. Daher wurden zur weiteren Klärung der Spezifität der isolierten Proteasen Hemmstoff-Tests durchgeführt.

4.3.2 Enzymhemmung

Die Untersuchungen der Substratspezifität mit den unterschiedlichen synthetischen Substraten ergab, dass die isolierten Proteasen aus *S. thermovulgaris* und *Paenibacillus sp* chymotrypsinähnliche Spezifitäten zeigten. Dieses Ergebnis wurde anhand der Untersuchung mit Hemmstoffe unterschiedlicher Spezifitäten gegen Serin-, Cystein- und Metalloproteasen bestätigt.

Die Tests mit Ethylendiamintetraessigsäure schliessen Metalloproteasen aus. Ebenfalls konnte durch die negativen Ergebnisse mit *trans*-Epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino)-butan (E-64) bewiesen werden, dass beiden Proteasen, keine Thiol-Gruppen im aktiven Zentrum besitzen und somit keine Cysteinproteasen sind. Mit den Serinproteasehemmstoffen Phenylmethylsulfonylfluorid, 4-(2-Aminoethyl)-benzol-sulfonylfluorid und Chymostatin wurde bei beiden Proteasen eine Hemmwirkung erzielt. Somit konnte gezeigt werden dass es sich bei beiden Enzymen um chymotrypsin-ähnliche Proteasen handelt.

4.4 Immobilisierung der isolierten Proteasen

In industriellen Prozessen erweisen sich lösliche Enzyme meist als wenig stabil und können nach ihrem Einsatz nicht mehr zurückgewonnen werden. Zur Stabilisierung von Enzymen werden diese häufig auf festen Oberflächen immobilisiert und in dieser Form angewandt. Im Papierspaltverfahren, einer Methode zur Restaurierung von geschädigten Dokumenten, kommen immobilisierte Enzyme auf Polyester-Vliese zur Anwendung (Nouaimi *et al*., 2001). Die für das Papierspaltverfahren entwickelte Immobilisierungsmethode wurde besonders für Trypsin optimiert. Es ist ein Verfahren zur schonenden Oberflächenbehandlung, das auch für die in dieser Arbeit isolierten Proteasen erprobt werden sollte.

Aufgrund ihrer hydrophoben Oberfläche wurden die Polyester-Vliese zuerst einer partiellen sauren Hydrolyse unterworfen (Carvajal *et al.,* 1975) und anschließend mit Dicyclocarbodiimid und N-Hydroxysuccinimid aktiviert. Über einen Abstandshalter (Spacer), das Rinderserumalbumin, wurde die Protease an das Vlies immobilisiert. Durch den Spacer wird sowohl die Mobilität des immobilisierten Enzyms verbessert, als auch die hydrophobe Wechselwirkung zwischen immobilisiertem Enzym und Matrix vermindert. Zudem wird das Enzym durch die hohe Protein-Spacer-Konzentration gegen Denaturierung und Selbstverdauung geschützt. Cuatrecasas (1971) konnte zeigen, dass eine gewisse Länge des Abstandshalters erforderlich ist, um sterische Hindernisse bei Wechselwirkung von Enzym und Substrat zu minimieren. Daher ist es von Vorteil, für eine bestimmte Anwendung Spacer unterschiedlicher Länge zu verwenden.

Im Vergleich zum Trypsin zeigten die immobilisierten Proteasen weniger Aktivität. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass nur weniger Enzyme als beim Trypsin an das Vlies gebunden wurde, möglicherweise besitzen die Enzyme weniger aktive Gruppen für die Anbindung. Eine alternative Erklärung wäre, dass durch die kovalente Fixierung der Proteasen an die hydrophobe Oberfläche des Vlieses die Proteasen an Aktivität verlieren. Schließlich wurden die Enzyme nach einer für Trypsin optimierten Methode an das Vlies gekoppelt. Trotzdem haben diese Versuche ergeben, dass die neu isolierten Proteasen auch durch diese Methode in aktiver Form

immobilisiert werden können. Zur Optimierung der Immobilisierungtechnik für die neu isolierten Proteasen und zur Steigerung der Aktivitätsausbeute sind nunmehr noch weitergehende Versuche nötig. Zunächst ist eine Überprüfung der Abstandhalter vorrangig, wobei andere hochmolekulare Spacer, wie PEG, Dextran und Aldehyd-Dextran in Frage kommen. Ebenfalls wäre eine Modifizierung der Kopplungs-bedingungen an das Vlies zu überlegen.

4.5 Immunologische Untersuchungen

Weitere Erkenntnisse zur Verwandtschaft der isolierten Protease aus *S. thermovulgaris* konnten aus immunologischen Untersuchungen gewonnen werden. Polyklonale Antikörper gegen diese Protease wurden in einem Kaninchen stimuliert und die IgG-Fraktion aus dem Serum durch Ammoniumsulfatfällung und Ionen-austauschchromatographie gewonnen. Als Nachweis der Antigene in komplexen Proteinlösung wurde eine Immunodiffusion nach Ouchterlony und eine Antigen Antikörper-Präzipitation in Lösung durchgeführt. Obwohl sich die gereinigten Antiförper gegen ihr Antigen als stabil erwiesen, war auf dem SDS-Gel hauptsächlich die schwere Kette als Bande bei ~ 60 kDa war gut sichtbar, während die nur die leichten Kette bei ~20 kDa nur schwach zu sehen waren. Die Kreuzreaktion mit Trypsin, Thermolysin ergaben keine positive Ergebnisse, dagegen ergab die Reaktion mit der Pronase einen direkten Abfall der Aktivität, so dass ganz offensichtlich eine Verwandtschaft der neu isolierten Protease aus *S. thermovulgaris* zu Pronase besteht.

4.6 Ausblick

In Hinblick auf weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der gereinigten Proteasen aus *S. thermovulgaris* und *Paenibacillus sp.* müsste für ihre genauere Identifizierung eine Sequenzanalyse mittels Edman-Abbau oder moderne Spektroskopieverfahren wie „MALDI-TOF-MS“ angewendet werden. Es könnten dabei Vergleiche mit bekannten Proteinsequenzen in Datenbanken herangezogen werden. Aufgrund der verbesserten Empfindlichkeit der Kernresonanz-Spektroskopie in den letzten Jahren könnte, diese auch für die Proteinanalytik angewendet werden (Landry *et al.*, 2000).

Eine Möglichkeit zur Verbesserung der biotechnologischen Anwendungs-möglichkeiten der isolierten Proteasen besteht in der Methode gezielter Aminosäure-Austausche zur künstlichen Erhöhung der Thermostabilität. In diesem Fall wären die beiden alkalischen Proteasen nicht nur von naturwissenschaftlichen Interesse, sondern könnten auch in der Lebensmittel- und Pharmaindustrie Verwendung finden (Kumar & Takagi, 1999).

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegender Arbeit wurden zwei extrazelluläre thermophile Proteasen aus den Bakterienstämmen *S. thermovulgaris* und *Paenibacillus sp.* erfolgreich isoliert. Für die Gewinnung beider Proteasen aus den oben genannten Mikroorganismen waren jeweils nur zwei Reinigungsschritte nötig, eine Ammoniumsulfatfällung und eine Ionenaustausch- bzw. Gelfiltrationschromatographie. Zur Untersuchung der Reinheit und Größebestimmung des Extraktes wurde neben der Messung der proteolytischen Aktivität und Proteinbestimmung verschiedene elektrophoretische Methoden (SDS- und native PAGE, 2D-Elektrophorese und Zymographie) durchgeführt.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit wurden beide Proteasen bezüglich ihre Spezifität und Größe charakterisiert. Die Untersuchung der Spezifität der Protease mit verschiedenen synthetischen Substraten ergab für beide Proteasen chymotrypsinähnliche Spezifität. Sie bevorzugen die Spaltung der Säureamidbindung an der Stelle von aromatischen Aminosäuren wie Tyrosin und Phenylalanin. Dies wurde durch Versuche mit unterschiedlichen Hemmstoffen bekräftigt. Mit den für Serinprotease spezifischen Hemmstoffen Phenylsulfonylfuorid und 4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid, wurde sowohl die Protease aus *S. thermovulgaris* als auch die Protease aus *Paenibacillus sp*. gehemmt. Dagegen zeigten Hemmstoffe gegen Metalloproteasen und den Cysteinproteasen keine Wirkung. Diese Ergebnisse bestätigten, dass es sich bei den isolierten Proteasen um Serinproteasen mit chymotrypsinähnliche Spezifität handelt.

Zur Größenbestimmung der Protease aus *S. thermovulgaris* und *Paenibacillus sp* wurden in erster Linie elektrophoretische Methoden angewandt. Die SDS-PAGE ergab für die Protease aus *Paenibacillus sp*. eine Molmasse von 18 kDa und für die Protease aus *S. thermovulgaris* eine Molmasse von 24 kDa. Für das native Protein aus *S. thermovulgaris* wurde mittels der Gelfiltration eine Molmasse von ~ 28 kDa ermittelt. Es handelt sich offensichtlich um eine monomere Protease. Bei der Protease

aus *Paenibacillus sp*. wurde für das native Protein ~ 12,3 kDa bestimmt.

Die Stabilitätsuntersuchungen beider Proteasen hinsichtlich Temperatur und pH-Einflüssen ergaben für die Protease aus *S. thermovulgaris* ein Temperaturmaximum bei 65°C und ein pH-Optimum zwischen 9-10. Die Protease aus *Paenibacillus sp*. dagegen hat ein Temperaturmaximum bei 45°C und war am stabilsten bei pH 8-9.

Ebenfalls gelang es in dieser Arbeit polyklonale Antikörper gegen der Protease aus *S. thermovulgaris* zu gewinnen und somit Verwandtschaftsbeziehungen zu Pronase aufzuzeigen, während Trypsin und Thermolysin keine Kreuzreaktionen ergaben.

Im letzten Teil der Arbeit wurden die isolierten Proteasen an Polyester-Vlies als festes Trägermaterial immobilisiert. Die Immobilisierung erfolgte über Rinderserumalbumin als Abstandhalter. Mit beiden Proteasen konnte mit dieser Methode Enzymaktivität auf dem Vlies nachgewiesen werden.

6 Materialien und Methoden

6.1 Materialien

6.1.1 Bakterienstämme

Der aus nigerianischen Bodenproben isolierte Bakterienstamm *S. thermovulgaris* wurden freundlicherweise von Frau Dr. Comfort Inyang, Makurdi, Nigeria bereitgestellt.

Der Bakterienstamm *Paenibacillus sp.* wurde ebenfalls aus Bodenproden aus Nigeria gewonnen und ist bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, Deutschland unter der Nummer DSM ID 96-633 deponiert.

6.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien hatten, soweit nicht anders angegeben, den Reinheitsgrad *„pro analysis“*. Glycerin, CHAPS, NaCl, Ethanol, Methanol, Eisessig, Dioxan, Trichloressigsäure, Silbernitrat und NaOH stammten von Merck Eurolab (Frankfurt, Deutschland). Ammoniumperoxodisulfat, Glycin, Bromphenolblau, Agarose, Harnstoff, Acrylamid, N,N-Methylenbisacrylamid, SDS und TEMED und Iodacetamid wurden von Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Von ICN Biomedicals GmbH (Eschwege, Deutschland) wurden Hefeextrakt, Nutrient Broth, Maltextrakt, Pepton, Trypton und Coomassie Brillantblau R 250 verwendet. Fluka Chemie AG (Buchs, Schweiz) lieferte Glukose, N-Hydroxylsuccinimid, N,N’-Dicyclohexylcarbodiimid, Natriumborat und Glutardialdehyd. Ammoniumsulfat, Kaliumdihydrogenphosphat, di-Kaliumhydrogenphosphat, BCA, TRIS, Aprotinin, Chymostatin, Azocasein, N-Benzoyl-arginin-p-Nitroanilid, N-Succinyl-L-phenyl-p-nitroanilid und Dextranblau aus *Leuconostoc ssp*. wurde von Sigma (Taufkirchen,

Deutschland) verwendet. BTEE, ATEE, E-64, EDTA, PMSF, TPCK, TLCK, Chymostatin, Pefabloc und DTT stammten von Serva (Heidelberg, Deutschland). Weiterhin kamen von Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) Chymotrypsin, Trypsin, LDH, Pronase und BSA zum Einsatz. Die Puffersubstanzen für die 2D-Elektrophorese NP0001, NP0002, NP0008, NP0009, sowie IPG Gelfolie ZM001, SDS-Fertiggel NP0330, Proteinmarker LC5677 und Ampholyt ZM0021 wurden von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Zusätzlich wurde eine PAGE Blue Fertigfärbelösung von Fermentas GmbH (St. Leon Rot, Deutschland) angewendet.

Für die Enzymreinigung wurden Sephacryl S-200 von Amersham Pharmacia (Freiburg, Deutschland), CM-52-Cellulose, DE-52-Cellulose von Whatman (Maidstone, UK) gebraucht. Die 10 kDa Protein-Leiter stammt von Biomol GmbH (Hamburg, Deutschland).

Die Gelatineproben wurden freundlicherweise von Frau Dipl.-Rest. Eva Galinsky Stuttgart zur Verfügung gestellt. Der verwendete Vliesstoff PET-Vlies FO-2413 stammt von Freudenberg (Weinheim, Deutschland).

6.2 Methoden

6.2.1 Stammhaltung und Reinheitsüberprüfung von *S. thermovulgaris*

Zur Erhaltung der Stammkultur wurden 200 ml einer frischen Hauptkultur von *S. thermovulgaris* (s. Kap. 6.2.2) an einer Tischzentrifuge in sterilen Röhrchen abzentrifugiert. Die abgesetzten Zellen wurden in 10 ml Hauptkulturmedium aufgeschlämmt, in sterilen Reaktionsgefäßen unter Zusatz von 15% Glycerin pipettiert und bei –80°C aufbewahrt.

Zur Überprüfung der Reinheit des Bakterienstammes *S. thermovulgaris* und zur Gewinnung von Einzelkolonien wurde Agar/Malz Platten gegossen. Für die Herstellung der Agar/Malz-Platten wurden 12 g Agar und 10 g Malzextrakt in 500 ml H_2O_{dest} (pH 7,0) und separat 4 g Glucose in 500 ml H_2O_{dest} sterilisiert. Anschließend wurden die beiden Lösungen vereint und je etwa 20 ml auf Petrischalen von einem Durchmesser von 9 cm verteilt. Nach Erstarren des Nährbodens wurden unter sterilen Bedingungen jeweils 100 µl der Stammkultur von *S. thermovulgaris* gleichmäßig auf die Platte verteilt und diese im Brutschrank bei 50°C für 3 Tage inkubiert.

6.2.2 Fermentation von *S. thermovulgaris*

Das Medium für die Anzucht von *S. thermovulgaris* enthielt in 1 l H_2O_{deion} 8 g Nutrient Broth, 2 g Hefeextrakt und 10 g Glucose, der pH-Wert der Lösung wurde auf 7,0 eingestellt. Das Medium wurde zunächst in 500 ml vorgelöst. 10 g Glucose wurde ebenfalls in 500 ml gelöst. Beide Lösungen wurden separat sterilisiert.

Die Anzucht der Zellen erfolgte mittels drei aufeinanderfolgenden Kulturen. Es wurden fünf Vorkulturen zu je 20 ml des oben angegebenen Medium in 100 ml Schikanekolben, sowie ein Kolben als Kontrolle mit je 200 µl der eingefrorenen Stammbakterien angeimpft und anschließend bei 50°C für 12 h mit einer Frequenz von 180 Hz in einen Wasserbadrundschüttler Typ Aquatron (Infors AG, Bottmingen, Schweiz) geschüttelt. Für die Gewinnung der extrazellulären Protease wurde ein 20 l Fermenter vom Typ Intensor (Giovanola Freres Monthy, Schweiz) verwendet.

Mit den gewachsenen Zellen wurden wiederum vier Vorkulturen mit je 100 ml Medium in vier 500 ml Schikanekolben angeimpft (10 ml). Diese wurden im Inkubator bei 50°C für 12 h geschüttelt. Mit je 10 ml der Vorkultur wurde die Hauptkultur, verteilt auf vier 2 l Schikanekolben mit je 250 ml Medium, angeimpft. Diese wurde ebenfalls bei 50°C für 12 h im Inkubator geschüttelt und direkt dem Animpfen des Mediums im Fermenter benötigt.

Für die Fermentation von *S. thermovulgaris* wurde 20 l des oben beschriebenen Mediums eingesetzt. Die Drehzahl des Fermentermotors lag bei 1200 U/min und die Belüftungsrate wurde auf 6-8 l/min eingestellt. Für die Fermentation wurde eine Temperatur von 50°C und eine Fermentationszeit von 96 h gewählt. Die Zelldichte wurde durch Trübungsmessung in steril entnommenen Proben bei 546 nm gemessen. Der pH-Wert wurde auf 7,2 eingestellt und über ein Regelkreislauf konstant gehalten. Bei Abfall des pH-Wertes wurden 1N NaOH zutitriert. Abschließend wurde die Zellmasse über eine Durchlaufzentrifuge vom Medium abgetrennt. Der Überstand wurde für die folgenden Reinigungsschritte bei -20°C gelagert.

6.2.3 Reinigung der Protease aus *S. thermovulgaris*

6.2.3.1 Ammoniumsulfatfällung

Die Proben im zellfreien Medium nach der Fermentation wurden mit Ammoniumsulfat konzentriert. Die Fällung wurde bei 80% Sättigung bei 4°C durchgeführt (Holtzhauer, 1988). Dazu wurden zu 1 l Medium 561 g festes Ammoniumsulfat unter langsamen Rühren zugegeben. Es wurde 6 h bei 4°C gerührt und der entstandene Proteinniederschlag in einer Zentrifuge von Typ Sorvall RC-5, (Kendro, Hanau, Deutschland) bei 8000 U/min für 30 min abzentrifugiert. Der Niederschlag (16 g) wurde anschließend in 30 ml 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5 aufgelöst.

6.2.3.2 Dialyse

Zur Entfernung von Ammoniumsulfat wurde die konzentrierte Proteinlösung einer Dialyse unterzogen. Der Dialyseschlauch (Visking, Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurde zuvor in einer verdünnten EDTA-Lösung für 10 min gekocht und dann mit Wasser gespült. Anschließend wurden 30 ml der Proteinlösung in den Dialyseschlauch gefüllt und dieser an beiden Seiten mit zwei Knoten verschlossen. Der Schlauch wurde in 1 l 0,05M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 gehängt und bei 4°C unter langsamen Rühren dialysiert. Der Puffer wurde dabei viermal nach jeweils 2 h gewechselt. Das Dialysat hatte ein Volumen von 50 ml und wurde für die weiteren Schritte bei -20°C aufbewahrt.

6.2.3.3 Ionenaustauschchromatographie:

Zur Reinigung des dialysierten Ammoniumsulfatniederschlags wurde als Kationenaustauscher Carboxymethyl-Cellulose vom Typ CM-52 in einer Chromatographiesäule (Länge: 20 cm; Durchmesser: 2 cm) verwendet. Das Säulenmaterial wurde mit mehreren Gelbettvolumina an 0,05 M Tris-HCl, pH 7,5 äquilibriert. Der dialysierte Ammoniumsulfatniederschlag (20 ml) mit einen Proteingehalt von 76 mg wurde auf eine Kationenaustauscher Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 300 ml eines aufsteigenden NaCl-Gradienten von 0 bis 0,5 M in 0,05 M Tris-HCl-Puffer pH 7,5 und einer Flussrate von 1 ml/min. Insgesamt wurden 100 Fraktionen von je 3 ml gesammelt. Der Verlauf der Elution wurde anhand der UV-Absorptionsmessung bei 280 nm am UV-Spektral-Photometer UV2100 (Shimadzu, Düsseldorf, Deutschland) verfolgt. Die Proteaseaktivität jeder zweiten Fraktion wurde mittels Azocasein-Test detektiert. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und mit Hilfe einer Rührzelle auf 7 ml eingeengt.

Zur Regenerierung des Säulenmaterials wurde das Gelmaterial von der Säule entnommen, in 100 ml 0,5 M HCl aufgeschlämmt und für 20 min zur Abtrennung von nicht mehr verwendbarem Gel (Überstand) stehen gelassen. Die CM-Cellulose wurde anschließend abfiltriert, mit H_2O gewaschen und für 20 min in 100 ml 0,5 M NaOH regeneriert.

Schließlich wurde das Gel bis zur Neutralität mit Wasser in einer Fritte unter Vakuum gewaschen und bis zur weiteren Verwendung in Ethanol aufbewahrt.

6.2.3.4 Proteinbestimmung

Bradford-Methode

Die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) erfolgte mit 0,5-5 µg BSA als Proteinstandard. Für die Herstellung des Bradford-Reagenz wurden 100 mg Coomassie Brillant Blue G-250 in 50 ml 95% Ethanol und 100 ml Phosphorsäure (85 %) gelöst. Die erhaltene Lösung wurde mit H_20 auf 1 L aufgefüllt. Zu 50 µl der Proteinprobe wurden 950 µl Bradford-Reagenz gegeben. Nach 5 min Inkubation wurde der entstandene blaue Farbkomplex detektiert. Die Eichgerade ist in Abb. 49 abgebildet.

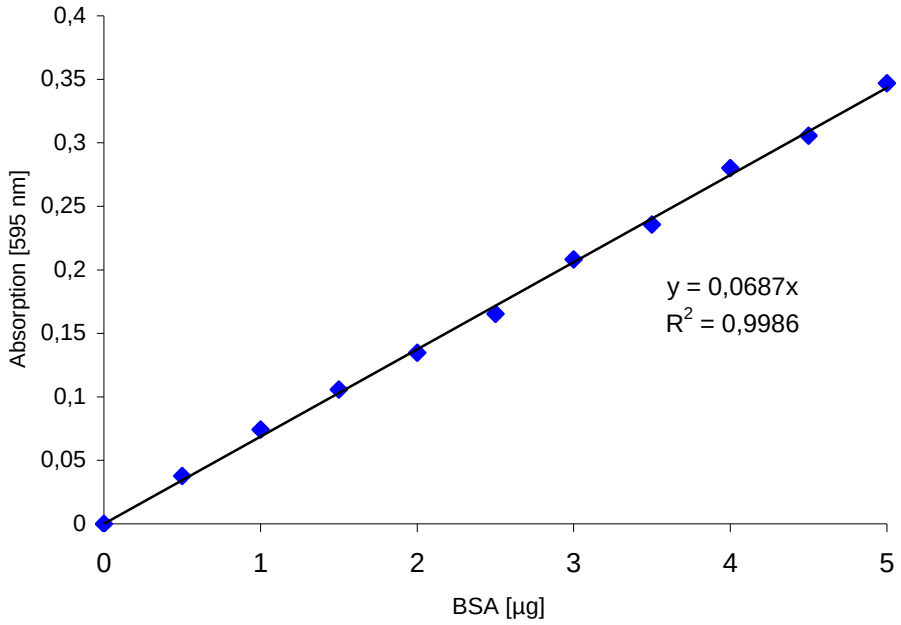

Abb. 49: Eichgerade für die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) mit einer BSA-Lösung.

BCA-Methode

Die BCA-Methode ist sehr empfindlich (0,5 µg/ml), schnell (ca. 10 min bei 50°C), zeigt kaum Lösungsmitteleinflüsse und ist daher auch für immobilisierte Proteine einsetzbar. Bei diesem Test bildet das Protein mit Cu^{2+}-Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret-Reaktion). Die Cu^{2+}-Ionen des Komplexes werden durch die Peptidbindung und durch oxidierbare Aminosäuren, wie Tyrosin, Tryptophan und Cystein, zu Cu^{+} reduziert, das mit Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbkomplex bildet. Ein weiterer Vorteil der BCA-Methode ist, dass die Verfärbung auf den Vliesen nicht so intensiv ist, wie sie beim Bradford-Test in Erscheinung tritt.

Die Absorption des Komplexes wurde bei 562 nm gemessen. Als Referenz wurde eine Eichgerade mit verschiedenen Konzentrationen einer BSA-Stammlösung aufgenommen. Die Absorptionsmessung bei 562 nm ist über einen breiten Bereich linear zur Proteinkonzentration (s. Abb. 50).

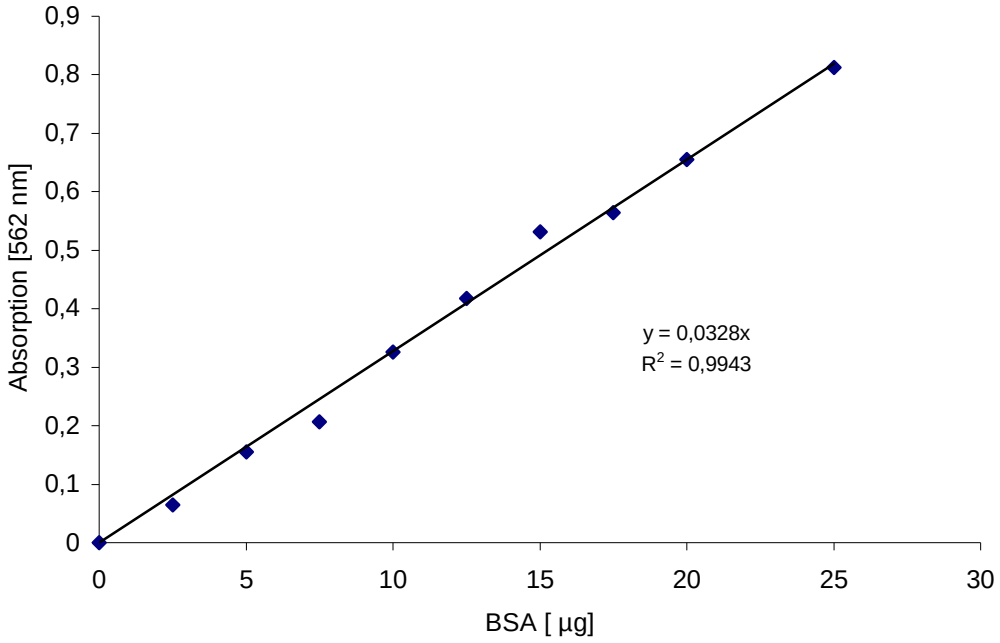

Abb. 50: BCA Eichgerade mit BSA als Standardprotein.

Für Lösung A wurden 100 ml H_2O vorgelegt und 1 g BCA-Na_2-Salz, 2 g Natriumcarbonat, 0,16 g Na_2-Tartrat, 0,4 g NaOH und 0,95 g $NaHCO_3$ zugegeben. Der pH-Wert wurde mit konz. NaOH auf 11,25 eingestellt. Für Lösung B wurde 1 g $CuSO_4$ x 5 H_2O mit H_2O auf ein Gesamtvolumen von 25 ml aufgefüllt. Lösung A und Lösung B wurde anschließend im Verhältnis 50:1 (v/v) gemischt (Lösung C) und sofort verwendet.

Für den BCA-Test wurden 0-50 µg Protein vorgelegt und mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Dann wurden 950 µl Lösung C zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden die Proben photometrisch bei 562 nm gegen H_2O gemessen.

6.2.3.5 Ultrafiltration

Die Konzentrierung der proteolytisch aktiven Fraktionen der einzelnen Reinigungsschritte erfolgte mit Hilfe der Ultrafiltration. Hierfür wurde eine Ultrafiltrations-Druckkammer (Amicon, Witten, Deutschland) mit einer polyethersulfonbeschichteten Membran der Porengröße 10 kDa eingesetzt (Millipore, Eschborn, Deutschland). Mit dieser Methode ist es ebenfalls möglich, Salze sowie niedermolekulare Verbindungen abzutrennen.

6.2.4 Medien und Anzucht von *Paenibacillus sp.*

Für die Anzucht von *Paenibacillus sp.* wurden 8 g Nutrient Broth in 1 l H_20 für die Vorkultur eingesetzt. Zur Kultivierung des Bakterienstammes wurde in einem ersten Schritt eine Vorkultur mit drei Schikanekolben mit je 50 ml Medium der oben genannten Zusammensetzung angesetzt, wobei zwei mit jeweils 200 µl Stammbakterien von *Paenibacillus sp.* angeimpft wurden und ein Kolben als Kontrolle diente. Die angeimpften Kolben wurden in einem thermostatisierbaren Inkubator kontinuierlich bei 120 U/min und 30°C für 24 h inkubiert. Anschließend wurden drei Kolben mit jeweils 200 ml des Hauptkulturmediums pH 7,0 befüllt.

Das Hauptkulturmedium bestand aus in 1 l H_20 gelösten 10 g Trypton, 7 g

Hefeextrakt, 1 g Magnesiumsulfat und 5 g Gelatine, mit der Vorkultur angeimpft und weitere 48 h bei 30°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen bei einer Drehzahl von 8000 U/min innerhalb von 30 min abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde verworfen und der Überstand für die weitere Aufarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

6.2.5 Reinigung der Protease aus *Paenibacillus sp.*

6.2.5.1 Ammoniumsulfatfällung und Dialyse

Es wurde analog wie bei *S. thermovulgaris*, beschrieben in Abschn. 6.2.3.1 und 6.2.3.2 verfahren.

6.2.5.2 Gelfiltration an Sephacryl S-200

Für die Gelfiltration wurde eine Kunststoffsäule mit der Länge von 90 cm und einem Durchmesser von 2 cm verwendet. Als Säulenmaterial wurde Sephacryl S-200 mit einem Trennbereich von 1 000 - 100 000 Da verwendet. Da das Säulenmaterial in 20%igen Ethanol aufbewahrt wird, musste dieses zunächst mit $H_2O_{dest.}$ gewaschen werden und mit mehreren Gelbettvolumina 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 äquilibriert werden. Dann wurden langsam 6 ml des dialysierten Ammonium-sulfatniederschlags aufgetragen und mit einem Fluss von 1 ml/min mit 0,05 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 eluiert. Es wurden Fraktionen zu je 3 ml gesammelt und jede zweite Fraktion getestet. Die Elutionsverlauf wurde durch UV-Absorption bei 280 nm verfolgt. Die Enzymaktivität wurde über den Azocaseintest bestimmt.

6.2.6 Elektrophoretische Methoden

6.2.6.1 Diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese

Zur Größebestimmung von Proteinen und deren Überprüfung auf ihre Reinheit wurde eine SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1970) durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf einer 10%-igen PAGE entsprechend ihrer Größe. Hierfür wurde die Elektrophoresekammer mit 250 ml Reservoirpuffer (3 g Tris und 14,4 g Glycin in 1 l Wasser) und 0,1% (w/v) Natrium-dodecylsulfat (SDS) aufgefüllt. SDS diente der Dissoziation der Proteine durch Unterdrückung der Protein-Protein-Wechselwirkung (Quartärstruktur). Außerdem entstand ein negativ geladener SDS-Proteinkomplex, der für die Trennung der Proteine im elektrischen Feld nötig ist.

Für die Elektrophorese wurde zu einer 20 µl Proteinprobe 20 µl SDS-Probenpuffer (10% SDS, 87% Glycerin, 3% 1 M Tris/HCl pH 6,8) und 2 µl Bromphenolblau gegeben und für 5 min gekocht. Die Elektrophoresekammer wurde mit 250 ml Reservoirpuffer (3 g Tris und 14,4 g Glycin in 1 l Wasser) und 0,25 g SDS aufgefüllt. Anschließend wurden die vorbereiteten Proben in die Taschen des Gels aufgetragen. Die Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE ist in Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Gele für die SDS-PAGE.

Gelzusammensetzung	**5%Trenngel (ml)**	**10% Sammelgel (ml)**
30:0,8 Acrylamid/Bis	6	1
Trennpuffer (1M Tris-/HCl pH 8,8) und Sammelgelpuffer (1M Tris-/ HCl pH 6,8)	2,25	2
10% SDS	0,18	0,08
H_2O	8,67	4,48
10% APS	0,15	0,1
TEMED	0,006	0,006

Die Elektrophorese wurde in einem vertikalen System bei 28 mA durchgeführt und war beendet sobald die Bromphenolblau-Front den unteren Rand des Gel erreicht hat (ca. 90 min). Nach Ablauf der Elektrophorese wurde das Gel aus der Elektrophorese-Kammer entnommen und die Proteinen mit der gewünschten Methode je nach ihrer Konzentration nachgewiesen. Zur Detektion der Banden wurden Farbreaktionen angewandt. Die Coomassiefärbung diente der unspezifischen Detektion von Proteinen (Nachweisgrenze bis zu 100 ng Protein). Empfindlicher ist die PAGE-Blue Färbelösung mit der bis zu 5 ng Protein detektiert werden konnten. Für geringe Proteinmengen wurde die Silberfärbung angewendet mit einer Nachweisgrenze von etwa 20 ng.

Coomassie-Färbung:

Für die Coomassie-Färbung wurde das Gel zur Fixierung und Färbung in einer wässrigen Coomassie Brilliantblau (45% (v/v) MeOH, 8% (v/v) Eisessig , 0,25% (w/v) Coomassie Brillant Blue G-250) inkubiert. Um die getrennten Banden anschließend sichtbar zu machen, wurde das Gel mit einer Lösung aus 250 ml EtOH, 150 ml Essigsäure und 600 ml H_20_{bidest} entfärbt.

Silber-Färbung:

Bei der Silber-Färbung wurden für die Fixierung 24 ml Essigsäure, 80 ml Ethanol und 100 µl Formaldehyd (37%) mit 200 ml H_2O_{bidest} aufgefüllt und auf das Gel in das Fixierbad gelegt. Anschließend wurde dreimal mit 50%igem Ethanol gewaschen. Für die Imprägnierung wurden 400µl 10%ige (w/v) $Na_2S_2O_3$ in 200 ml H_2O_{bidest} aufgefüllt. Das Gel wurde imprägniert und danach dreimal jeweils 30 s mit H_2O_{bidest} gewaschen. Das Silberfärbungsreagenz wurde aus 0,4 g Silbernitrat und 150 µl Formaldehyd (37%) in 200 ml H_2O_{bidest} hergestellt und das Gel für 20 min behandelt. Der Entwickler bestand aus 18 g Na_2CO_3, 12 µl 10%ige (w/v) $Na_2S_2O_3$, 150 µl Formaldehyd (37%) gelöst in 300 ml H_2O_{bidest}. Nachdem die Banden sichtbar geworden sind, wurde das Gel mit H_2O_{bidest} gewaschen und die Reaktion mit 24 ml Essigsäure und 80 ml Ethanol in 200 ml H_2O_{bidest} gestoppt. Zum Schluss wurde nochmals mit 50%igem Ethanol gewaschen.

6.2.6.2 Diskontinuierliche Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen

Die Zusammensetzung des Gels bei der nativen Gelelektrophorese war identisch mit den Gelen für die diskontinuierlichen SDS-Elektrophorese (s. Tabelle 11), es wurde jedoch in der Probe kein SDS zugegeben.

Jeweils 20 µl (0,7µg), mit 20 µl Probelösung wurdenmit einer Rohrzuckerlösung (ca. 1 mg pro ml) und 2µl Bromphenolblau gemischt und direkt auf das Gel gegeben. Die Elektrophoresekammer wurde mit 250 ml Reservoirpuffer aufgefüllt. Die Trennung erfolgte bei einer Stromstärke von 28 mA. Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel entnommen gefärbt.

6.2.6.3 Zweidimensionale Gelektrophorese

Für die Probenvorbereitung zur zweidimensionalen Gelelektrophorese wurden 5 µl Rohextrakt mit 150 µl Rehydratisierungs-Puffer versetzt. Für die Herstellung dieses Puffers wurden 12 g Harnstoff, 0,5 g CHAPS, 125 µl Ampholyt und 0,5 ml 0,1% (w/v) Bromphenol-Blau Lösung in 25 ml H_20 gelöst. 1 ml der gewonnenen Lösung wurden mit DTT bis zu einer Endkonzentration von 20 mM versetzt.

Die gesamte Probelösung wurde auf die Gelfolie, eingespannt in die Kassette der Apparatur, aufgetragen und über Nacht bei RT rehydratisiert. Für die isoelektrische Fokussierung wurde die Kassette in das 2D-Gelelektrophorese-Gerät überführt (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und nach folgendem Spannungsverlauf getrennt.

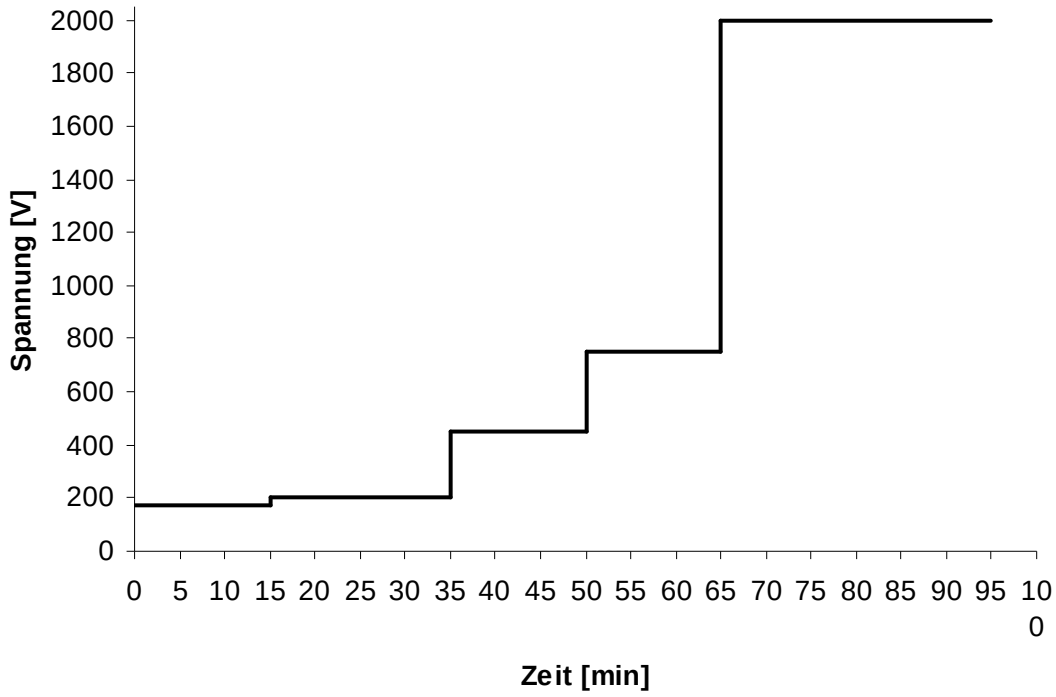

Abb. 51: Spannungsverlauf für die isoelektrische Fokussierung

Im zweiten Schritt der 2D-Gelelektropherese wird die Gelfolie in einer reduzierenden Lösung (500 µl reduzierende Lösung + 4,5 ml Probenpuffer) für 15 min bei RT in einem Glasröhrchen äquilibriert. Anschließend wird die Lösung abdekantiert und der Fokussierungsstreifen mit 5ml Alkylierungslösung (116 mg Iodacetamid gelöst in 5 ml Probenpuffer) für 15 min bei RT inkubiert und wiederum abdekantiert. Nach der Alkylierung wird der Fokussierungstreifen mit der Gelseite nach unten auf ein trägerfoliengestütztes SDS-PAGE-Fertiggel (4-12% Gel) von der Firma Invitrogen übertragen und mit 400 µl 0,5% (w/v) wässriger Agaroselösung fixiert. Anschließend wurde das SDS-Gel in die Elektrophorese-Kammer eingespannt. Nach dem Auftragen von 2 µl Proteinmarker und Auffüllen der Kammer mit 1 l Laufpuffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurde die SDS-PAGE bei 200 V für 40 min durchgeführt. Nach Beenden der Elektrophorese wurde das Gel entnommen und die aufgetrennten Proteine (Spots) mit Silberfärbungsreagenz sichtbar gemacht.

6.2.6.4 Proteolytische Aktivitätsbestimmung über die Zymographie

Ein weitere Möglichkeit der Charakterisierung von Proteinen mit Hilfe einer elektrophoretischen Methode ist die Zymographie (Wagstaff *et al*. 2002; Caldas *et al.* 2002; Leber & Balkwill 1997; Kleiner & Stetler-Stevenson 1994)**.** Bei dieser Technik wird die Proteaseaktivität des getrennten Proteins in einem 10 %-iges Polyacrylamidgel detektiert. Die Proteine werden hierbei unter denaturierenden, nicht aber reduzierenden Bedingungen getrennt. Das Proteinsubstrat, meistens Gelatine, wird dabei mit dem Acrylamid in das Gel copolymerisiert. An der Stelle, wo die Gelatine verdaut wird, erscheint nach Anfärbung mit Coomassie Brilliantblau eine weiße Bande.

Zur Herstellung des Trenngels für die Zymographie wurden 6 ml Acrylamid / N-N'-Bisacrylamidlösung im Verhältnis 30:0,8 (w/w) vorgegeben. Zu dieser Lösung wurden nachfolgend 2,25 ml Tris HCl (pH 8,8), 7 ml H_2O_{bidest}, 180 µl 10% (w/v) SDS-Lösung, 2 ml 0,1% (w/v) Gelatinelösung, 100 µl 12% (w/v) Ammoniumperoxidisulfat und 6 µl TEMED zupipettiert. Das Sammelgel bestand aus 1 ml Acrylamid/N-N'-Bisacrylamidlösung im Verhältnis 30:0,8 (w/w). Zu dieser Lösung wurden nachfolgend 2 ml Tris HCl pH (6,8); 80 µl 10% (w/v) SDS-Lösung, 4,48 ml H_2O_{bidest}; 100 µl 12% (w/v) Ammoniumperoxidisulfat und 6 µl TEMED zupipettiert.

Die Polymeristion der Gele erfolgte in einer Gelkammerapparatur SE 250 (Hoefer Pharmacia Biotech Inc.,Uppsala, Schweden). Als Reservoirpuffer wurde hier wie bei der SDS-PAGE der Tris-HCl pH 8,3 benutzt. Die Probelösung wurden im Verhältnis 1:1:0,1 (v/v/v) (Probe:Probenpuffer:Bromphenolblau) zusammengegeben. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 28 mA.

Nach Beenden der Elektrophorese wurde das Gel aus der Kammer entnommen und für 1 h in einer wässrigen 2,5%igen (v/v) Triton 100-Lösung auf einem Proben-Schüttler inkubiert. Dann wurde das Gel in einer Petrischale mit 0,05 M Kaliumphosphat-Puffer pH 7,5 über Nacht bei 30°C für Protease aus *Paenibacillus sp.* bzw. 50°C für Protease aus *S. thermovulgaris* über Nacht inkubiert. Die anschließende Färbung des Gels erfolgte mit einer PAGE Blue-Fertiglösung. Das Gel wurde 3x mit H_2O_{bidest} gewaschen und 60 min in der Färbelösung inkubiert. Die anschließende Entfärbung erfolgt mit H_2O_{bidest} für 5 min.

6.2.7 Größenbestimmung an Sephacryl S-200

Zur Größebestimmung der isolierten Protease wurde eine chromatographische Trennung auf Sephacryl S-200 durchgeführt. Die Kunststoffsäule hatte eine Länge von 74 cm und einen Durchmesser von 2 cm. Als Standardproteine wurde 1 mg Dextranblau aus *Leuconostoc ssp.* (2000 kDa), 100 µg Katalase aus Rinderleber (240 kDa), 1 mg BSA (67 kDa) und 1mg LDH aus Schweineherz (140 kDa) verwendet. Zur Überprüfung des molekularen Masse der gereinigten Protease aus *S. thermovulgaris* wurden 3 ml mit einen Proteingehalt (1,65 mg) eingesetzt.

Die Säule wurde zunächst mit 0,05 M Tris-HCl (pH 7,5) und 1 mM $CaCl_2$ äquilibriert und anschließend die Probe zusammen mit den verschiedenen Eichproteinen aufgetragen. Die Elution erfolgte mit demselben Puffer mit einer Elutionsgeschwindigkeit von etwa 0,8 ml/min. Der Lauf der Gelfiltration betrug ungefähr 5 h. Es wurden Fraktionen in Abständen von 3 min aufgesammelt. Von jeder zweiten Fraktion wurde die UV-Absorption bei 280 nm und die Enzymaktivität der Protease mittels Azocasein Tests bei 350 nm gemessen.

6.2.8 Enzymtests

6.2.8.1 Azocasein

Beim Azocasein-Test (Brock, 1982) spaltet die Protease aus dem Substrat nicht nur Aminosäuren und Peptide, sondern auch die Azogruppe ab. Die abgespaltenen Azokomponenten sind in TCA löslich und können somit direkt photometrisch gemessen werden. Dabei ist die Aktivität definiert als die Enzymmenge, die unter Testbedingungen (50°C) eine Absorptionsänderung von einer Einheit pro 30 min bewirkt (Kundu, 2000). Zu 500 µl 0,2%-iger Azocasein wurden 200 µl Enzymlösung gegeben und 30 min bei 50°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 200 µl 10 % (w/v) TCA gestoppt und die Lösung nach 10 min abzentrifugiert. Die Absorption wurde photometrisch bei 350 nm gegen den Leerwert gemessen.

6.2.8.2 N-Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid (BAPNA)

Bei der zeitabhängigen Aktivitätmessung mittels BAPNA wird die freigesetzte Menge des Chromophors p-Nitroanilid spektroskopisch bei 405 nm und 50°C verfolgt. Für p-Nitroanilid beträgt der Absorptionskoeffizient ε_{405} = 10,2 x 10^3 l*mol^{-1}*cm^{-1} (Fiedler, 1978), d ist die Schichtdicke der Küvette. Um die Enzymaktivität (Konzentrationsänderung/Zeit) zu berechnen wurde folgende Formel benutzt:

$$\frac{U}{ml} = \frac{\Delta A / \min * V_{küvette}}{\varepsilon * d * V_{Probe}} \qquad (5)$$

Hierbei ist die Aktivität als die Enzymmenge (U) definiert, die in einer Minute 1 µmol BAPNA hydrolysiert (Wachsmuth, 1966). Um die Aktivität des löslichen Enzym zu bestimmen wurden 167 µl einer 20 mM BAPNA-Lösung zusammen mit 660 µl Tris-HCl pH 7,5 und 70 µl Enzym pipettiert. Die Aktivität wurde 5 min bei 405 nm am Photometer gemessen.

6.2.8.3 Succinyl-phenylalanin-p-nitroanilid (SUPHEPA) und Benzoyl-tyrosin-p-nitroanilid (BTPA)

Bei der Aktivitätsbestimmung von Proteasen mit SUPHEPA bzw. BTPA erfolgte die Messung des Chromophors p-Nitroanilid ebenfalls durch Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm. Die Aktivität ist definiert als die Enzymmenge (U), die in einer Minute 1 µmol SUPHEPA bzw. 1 µmol BTPA hydrolysiert. Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde mit Hilfe des Absorptionskoeffizienten ε_{405}= 10,2 x 10^3 (l mol^{-1} cm^{-1}) über das Lambert Beer'sche Gesetz berechnet.

Beim Test mit SUPHEPA als Substrat wurde zum Starten der Reaktion 500 µl 0,2 M Triethanolamin pH 7,8 und 450 µl 2 mM SUPHEPA zu 50 µl Enzymlösung pipettiert. Die Absorptions-Zunahme wurde an einen thermostatisierbaren Photometer bei 405 nm für 5 min verfolgt.

Für die Aktivitätsbestimmung mit BTPA wurden 450 µl 1 mM BTPA (in DMSO) und 500 µl 0,05 M Tris-HCl (pH 7,5) zu 50 µl Enzymlösung pipettiert. Die Absorptions-Zunahme wurde bei 405 nm für 5 min photometrisch verfolgt.

6.2.8.4 N-Benzoyl-L-tyrosin-ethylester (BTEE)

Mit Hilfe des Substrats BTEE wurde die Protease- und Esteraseaktivität der Proteasen aus *S. thermovulgaris* und *Paenibacillus* sp. getestet. Diese Endopeptidase ist spezifisch für chymotrypsin-ähnliche Enzyme, wobei die Spaltung des Ethylesters an der Aminosäure Tyrosin stattfindet. Die Abspaltung des Esters bedingt eine Zunahme der Absorption bei 256 nm. Der Absorptionskoeffizient betrug in diesem Fall ε_{256} = 96201 l*mol^{-1}*cm^{-1}. Die Zunahme der Aktivität wurde an einen thermostatisierbaren Photometer gemessen. Dabei wurde die Aktivität als die Enzymmenge definiert die in eine Minute 1 µmol BTEE hydrolysiert.

Um die Esterase-Aktivität zu testen wurde eine 1 mM BTEE-Lösung in 50% Methanol hergestellt. Für den Test wurden 500 µl Substrat und 460 µl Tris HCl (pH 7,8) vorgelegt, und die Reaktion mit 50 µl Enzym gestartet. Die Absorptionszunahme bei 256 nm durch die Dissoziation von N-Benzoyltyrosin wurde 5 min bei der erforderlichen Temperatur verfolgt.

6.2.8.5 Katalase

Die Reduktion von H_2O_2 zu H_2O durch die Katalase wird durch die zeitliche Abnahme der Absorption bei 240 nm spektrometrisch verfolgt (Bergmeyer, 1955). Für die Testmischung wurden 50 ml 0,1 M Kaliumphosphat (pH 7,0) und 30 µl H_2O_2 verwendet. Aus der Mischung wurden 900 µl in eine Quarz-Küvette gegeben, die Reaktion mit 100 µl der einzelnen Fraktionen gestartet und die Absorptionsabnahme photometrisch detektiert.

6.2.8.6 LDH

Die LDH katalysiert die Reduktion von Pyruvat zu Lactat. Die Reaktion wird über die Absorptionsabnahme des Cosubstrats NADH bei 340 nm verfolgt. Für die Durchführung des Testes (Bergmeyer, 1983) wurden 920 µl 0,1 M Kaliumphosphat (pH 7,0), 10 µl 0,01 M NADH und 20 µl 0,1 M Pyruvatlösung in eine Küvette pipettiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl der einzelnen Protein-Fraktionen gestartet und photometrisch verfolgt.

6.2.9 Bestimmung des pH Optimums

Zur Bestimmung des pH-Optimums der isolierten Proteasen aus *S. thermovulgaris* und *Paenibacillus sp.* wurden jeweils 0,2%ige (w/v) Azocaseinlösungen in Teorell-Stenhagen-Puffer in Bereich von pH 3-13 hergestellt. Für die Herstellung des Universalpuffers wurden 100 ml 0,22 M Citronensäure, 100 ml 0,33 M Phosphorsäure und 3,54 g Borsäure in 343 ml NaOH gelöst und mit H_2O auf 1 l aufgefüllt. Die gewünschten pH-Werte wurden mit HCl eingestellt.

200 µl der Enzymlösungen wurden mit den unterschiedlichen Azocaseinlösungen für 30 min bei der jeweiligen Temperatur (50°C bei *S. thermovulgaris*) und (30°C bei *Paenibacillus sp.*) inkubiert. Der aktuelle pH wurde am Ende nochmals mit einer pH-Elektrode kontrolliert. Die Reaktion wurde mit TCA gestoppt und die Absorption bei 350 nm gemessen.

6.2.10 Immunologische Untersuchungen

6.2.10.1 Produktion von Antikörpern

Für die Antikörperbildung wurde ein Kaninchen mit der lyophilisierten Protease aus *S. thermovulgaris* immunisiert. Es wurden 3 mg der lyophilisierten Protease dafür bereit gestellt. Für die Gewinnung von polyklonalen Antikörper wurde die Firma Charles River (Kisslegg, Deutschland) beauftragt. Es wurde nach folgendem Protokoll gearbeitet:

Bei der primären Injektion wurde 0,3 ml des Antigens zusammen mit der gleichen Menge an Freund's Adjuvant dem Kaninchen subkutan an verschiedenen Stellen in die Rückenhaut appliziert. Die zweite Injektion erfolgte nach 4 Wochen mit 0,4 ml Antigen. Nach der 2. Injektion wurde eine erste Serumprobe entnommen, um den positiven Verlauf der Immunisierung zu testen. Nach weiteren drei Wochen wurde die dritte Injektion mit ebenfalls 0,4 ml appliziert. Hier wurde ebenfalls eine Blutprobe zum Testen aufbewahrt. Einen letzte Injektion fand eine Woche später mit demselben Volumen statt. Nach dieser Injektion und nach positiver Reaktion auf Immunoglobuline im Serum wurde das Kaninchen entblutet. Das gewonnene Kaninchenserum hatte ein Volumen von 65 ml. Diese Serumfraktion kann über Jahre bei –70°C aufbewahrt werden.

6.2.10.2 Ammoniumsulfatfällung:

Für den ersten Reinigungsschritt wurden 20 ml des Serums mit 0,05 M Tris-HCl pH 8,0 im Verhältnis 1:1 (v/v) verdünnt und mit 40 ml einer 50%igen (w/v) Ammoniumsulfatlösung langsam (innerhalb von einer Stunde) ausgefällt. Anschließend wurde das Gemisch über Nacht bei 4°C gerührt. Am nächsten Tag wurde die Lösung für 15 min bei 15000 U/min zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 6 ml 0,05 M Tris-HCl (pH 8,0) gelöst und dreimal jeweils 2 h bei 4°C gegen 500 ml 0,05 M Tris-HCl (pH 8,0) dialysiert. Das Volumen des Dialysats betrug 14 ml.

6.2.10.3 Anionenaustauscher:

Im zweiten Reinigungsschritt wurde Anionenaustauschers DE-52-Cellulose verwendet. Es wurde eine Kunststoffsäule der Maße 25∗2 cm benutzt. Vor der Auftragung des in 0,05 M Tris-HCl (pH 8,0) gelösten Ammoniumsulfatpräzipitats wurde das Gelmaterial mit mehreren Gelbettvolumina 0,05M Tris-HCl (pH 8,0) äquilibriert bis der pH-Wert im Auslauf dem des Vorratsgefäßes entsprach. Es wurden 6 ml des dialysierten Ammoniumsulfatpräzipitat auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 200 ml eines 0-0,3 M NaCl-Gradienten in 0,05 M Tris-HCl pH 8,0. Die Fließgeschwindigkeit war 1 ml/min bei 4°C. Es wurde 80 Fraktionen zu 3 ml gesammelt.

Die UV-Absorbtionsmessung erfolgte bei 280 nm. Ebenfalls wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford von den einzelnen Reinigungsschritten bei der Antikörperreinigung durchgeführt. Um die Reinheit der Immunoglobulin-Fraktion zu überprüfen wurde eine SDS-PAGE analog Kap. 6.2.6.1 durchgeführt.

6.2.10.4 Immunodiffusion nach Ouchterlony

Für die Durchführung des Immunodiffusion nach Ouchterlony wurden 1,4 % (w/v) Agarose Platten gegossen. Es wurden 1,4 g Agarose in 100 ml PBS-Puffer (pH 7,4) unter Erhitzung aufgelöst bis eine klare Lösung entstand. Nach Abkühlen auf 50°C wurden Platten mit einen Durchmesser von 3,5 cm gegossen. Nachdem die Platten erstarrt waren, wurden mit Hilfe einer Stanze insgesamt 7 Mulden (Ø 0,4 cm) wobei eins in der Mitte der Platte war. In die Zentralmulde wurden 20 µl Antigen gegeben. Die peripheren Löcher enthielten 20 µl Antikörper mit verschiedenen Verdünnungen (1:1; 1:2; unverdünnt). Die Agaroseplatten wurden bei 4°C 2-3 Tage inkubiert.

6.2.10.5 Antigen-Antikörper Reaktion

Für diesen Test wurde eine Versuchreihe mit verschiedenen Volumina des Antikörpers angesetzt. Zu jeweils 150 µl der gereinigten Enzymfraktion wurden 0-10 µl Antikörperlösung zugegeben und mit 0,05 M Tris-HCl (pH 7,5) auf 200 µl aufgefüllt. Es wurde für 1 h bei RT inkubiert, danach 30 min auf Eis gekühlt und anschließend abzentrifugiert. Die Aktivität im Überstand wurde über den Azocaseintest bestimmt.

6.2.11 Immobilisierung der Protease an Polyester

6.2.11.1 Aktivitätsmessung der immobilisierten Proteasen mit Gelatine als Substrat

Um zu testen, ob die Immobilisierung erfolgreich war, wurden Gelatineplatten gegossen. Eine 33%ige (w/v) Gelatinelösung wurde in 0,05M Kaliumphosphat pH 7,5 hergestellt. Die Gelatine wurde unter langsamen Erhitzen in einen 60°C Wasserbad aufgelöst. Danach wurden 1 ml der aufgelösten Gelatine in kleine Petrischalen (Ø 3,5cm) gegossen. Nachdem die Platten erstarrt waren, wurden die kleinen Vliesstücke mit dem gekoppelten Enzym auf die Gelatine gelegt und über Nacht bei 30°C inkubiert.

6.2.11.2 Aktivitätsmessung der immobilisierten Proteasen mit dem Azocaseintest

Für die Aktivitätmessung der immobilisierten Protease wurde der Azocaseintest durchgeführt. Die Polyester-Vliese wurden hierbei für 1 h in 700 µl 0,2% (w/v) Azocaseinlösung bei 50°C (für *S. thermovulgaris*) bzw. 30°C (für *Paenibacillus)* inkubiert. Anschließend wurde das Vlies aus der Lösung entnommen und 300 µl 10% (w/v) TCA zupipettiert. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und die Aktivität bei 350 nm gemessen.

7 Literatur

Ackermann, T. (1992) „Physikalische Biochemie“, Springer Verlag, Berlin.

Adams, M.W.W., Perler, F.B., Kelly, R.M. (1995) J. Biotechnol. 13, 662-668.

Alber, T. (1989) Annu. Rev. Biochem. 58, 765-798.

Ash, C.; Farrow, J.A.E.; Waltbanks, S.; Collins, M.D. (1991) Lett. Appl. Microbiol. 13, 202-206.

Beavis, R.; Chait, B. (1996) Methods Enzymol. 270, 519-551.

Bergmeyer, H.U. [Hrsg.], (1983) „Methods of enzymatic analysis“, 3. Aufl., Vol. 3, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Bergmeyer, H.U. [Hrsg.], (1984) „Methods of enzymatic analysis“, 3. Aufl. Vol. 5, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Betz, S.F. (1993) Protein Sci. 2, 1551-1558.

Bone, S.; Ginzburg, B.Z.; Morgan, H.; Wilson, G.; Zaba, B.(1996) Phys. Med. Biol., 41, 45-54.

Buchanan, R.E.; Gibbon, N.E. [Hrsg.], (1974) “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology”, 8. Aufl., Williams & Wilkins, Baltimore.

Bradford, M.M. (1976) Anal.Biochem.,72, 248-252.

Brock, T.D. (1967) Science, 158, 1012-1019.

Brock, T.D. (1978) “Thermophilic microorganisms and life at high temperature”, Springer Verlag, New York.

Brock, F. M.; Frosberg, C.W.; Buchanan-Smith, J.G. (1982) Appl. Environ. Microbiol. 44, 561-569.

Bruins, M.E.; Janssen, E.M.; Boom, R.M. (2001) Appl. Biochem. Biotecn. 90, 155-186.

Brückle, I.; Dombrogio, J. (2000) J. Am. Inst. Conserv. Hist. Art. Works 39, 295-235

Bisswanger, H. (2000) „Enzymkinetik“, 3. Aufl., Wiley-VCH, Weinheim.

Bisswanger, H.(2004) “Practical Enzymology”, Wiley-VCH, Weinheim.

Buchner, J. (2002) Cell Mol. Life Sci. 59, 1587-1588.

Burggraf, S., Heyder, P., Eis, N. (1997) Nature, 385, 780-786.

Caldas, C.; Cherqui, A.; Pereira, A.; Simoes, N. (2002) Appl. Environ. Microbiol. 68, 1297-1304.

Campell, L.L. (1955) Arch. Biochem. Biophys. 54, 154-161.

Cannon, J.; Chen, L.; Flickinger, M.; Tsao, G. (1984) Biotechn. Bioeng. 16, 167-173.

Chou, C.C.; Ladish, M.R.; Tsao, G.T. (1976) Appl. Environ. Microbiol. 32, 489-493.

Claus, D; Berkeley, R.C.W. (1986) in “Bergey’s manual of systematic bacteriology”, Sneath, P.H.A.; Mair, N.S.; Sharpe, M.E., Holt, J.G. [Hrsg.], Vol. 2. Williams & Wilkins., Baltimore.

Corbaz, R., Gregory, P.H., Lacey, M.E. (1963) J. Gen. Microbiol. 32, 449-456.

Cowan, D. A. [Hrsg.] (1991) Industrial Enzymology, in “Biotechnology; the Science and the Business” (Moses, V. & Capes, R. E. eds.) Harwood Academic Publ., London, pp 311-340.

Cooper, T.G.(1981) „Biochemische Arbeitsmethoden“, 1. Aufl., Walter De Gruyter, Berlin.

Craveri, R.; Pagani, H. (1962) Ann. Microbiol. 12, 115-130.

Cuatrecasas, P.; Parikh, I. (1972) Biochemistry, 11, 2291-2299.

Dachtler, M., Glaser, T., Händel, H., Lacker, T., Albert, K. (2000) in “Encyclopedia of Separation Science”, Wilson, I.D., Adlard, E.R., Cook, M., Poole, C.F. [Hrsg.], S. 747-760, Academic Press, London.

Daniel, R.M.; Danson, M.J. (1995) J. Mol. Evol. 40, 559-563.

Daniel, R. M.; Cowan, D. A. & Morgan, H. W. (1981) Chem. New Zealand 45, 94-97.

Danson, M.J.; Fersht, A.R.; Perham, R.N. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5386-5390.

Declerck, N.; Machius, M.; Chambert, R., Wiegand, G.; Huber, R.; Gaillardin, C. (1997) Protein Engineering, vol.10 no.5, 541-549.

Degryse, E.; Glabsdorff; N.; Pierard, A. (1978), Arch.Microbiol.117, 189-196.

Desai, A.J.; Dhala, S.A. (1967), Antonie van Leeuwenhoek 33, 137-144.

Dill, K.A. (1990) Biochemistry 29, 7133-7155.

Eijsink, V.G.; Van der Zee, J.R.; Van den Burg, B.; Vriend, G.; Venema, G. (1991) FEBS Lett. 283, 13-16.

Farrell, J.; Campbell, L.L. (1969) Adv. Microbiol. Physiol. 3, 83-109.

Fiedler, F.; Geiger, R.; Hirschauer; C.; Leysath, G. (1978) Hoppe Seyler Z. Physiol. Chem. 259, 1667-1673.

Fogg, G.E. (1967) Phil. Transact. Royal Soc., Ser. B. 252, 279.

Gemeiner, P. [Hrsg.] (1992) in „Enzyme Engineering“, Ellis Horwood, New York 13-119.

Goodflow, M.; Manfio, G.P.; Chun, J. (1997) in “Species: the units of biodiversity”, Claridge, M.F.; Dawah, H.A.; Wilson, M.R. [Hrsg.], Chapman & Hall, London 25-59.

Creighton, T.E. (1988) Bioessays 8, 57-63.

Grütter, M.G.; Hawkes, R.B.; Mathwes, B.W. (1979) Nature, 277, 6339-6346.

Hausmann, K.; Kremer, B.P. [Hrsg.] (1994) in „Extremophile – Mikroorganismen in ausgefallenen Lebensräumen“, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim

Harlow, E.; Lane, D. [Hrsg.] (1988) “Antibodies, a practical laboratory manual”, Cold Spring Harbor Laboratory.

Holtzhauer, M. (1988) „Biochemische Labormethoden“, Springer Verlag, New York.

Hough, D.W.; Danson, M.J. (1999) Curr. Opin. Chem. Biol., Vol 3, 39-46.

Huber, H., Stetter, K.O. (1998) J. Biotechnol. 64, 39-52.

Hummel, B.C.W. (1959) Can. J. Biochem. Physiol. 37, 139.

Inyang, C.U.; Gebhardt, U.; Obi, S.K.C.; Bisswanger, H. (1995) Appl. Microbiol. Biotechnol. 43, 632-638.

James, G.T. (1978) Anal. Biochem. 86, 574.

Janicke, R. (2000) J. Biotechnol. 79, 193-203.

Kim, B.; Sahin, N. Minnikin, D.E., Zakrzewska-Czerwinska, J., Mordarski, M.; Goodflow, M, (1999) Int. J. Syst. Bacteriol. 49, 7-17.

Kleiner, D.E.; Stetler-Stevenson, W.G. (1994) Anal. Biochem. 218,325-329.

Kotsuka, T.; Akanuma, S.; Tomuru, M.; Yamagishi, A.; Oshima, T. (1996) J. Bacteriol. 178, 723-727.

Kutzner, K.J. (1986) in: “The Prokaryotes, A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria”, Vol.2, Starr, M.P.; Stolp, H.; Trüper, H.G.; Balows, A.; Schlegel, H.G. [Hrsg.], Springer-Verlag, New York, 2028-2090**.**

Kumar, C.G., Takagi, H. (1999) Biotechnol. Adv. 17, 561-594.

Kundu, S.; Sundd, M.; Jagannadham, M.V.(2000) J. Agric. Food. Chem. 48, 171-179.

Kunitz, M. (1947) J. Gen. Physiol. 30, 291-310.

Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685.

Landry, F. (2000) Anal. Biochem. 279, 1-8.

Lasa, I.; Berenguer, J. (1993) Microbiologia 9, 77-89.

Leber, T.M.; Balkwill, F.R. (1997), Anal. Biochem. 249, 24-28.

Lehmacher, A.; Bisswanger, H. (1990), Biol. Chem. Hoppe-Seyler 371, 527-536.

Lehmacher, A.; Bisswanger, H. (1990b) J. Gen. Microbiol. 136, 679-686.

Mansfeld, J.; Vriend, G.; Dijkstra, B. W. (1997) J. Biol. Chem. 272, 11152-11156.

Moeschel, K.; Nouaimi, M.; Steinbrenner, C.; Bisswanger, H. (2003) Biotechnol. Bioeng. 82 (2), 190-199.

Moneke, A.M.; Obi, S.K.C.; Bisswanger, H. (1998) Appl. Microbiol. Biotechnol. 50,

552-557.

Muro, T.; Murakami, T.; Tominga, Y.; Tokuyama, T.; Okada, S. (1991) Agr. Biol. Chem. 55, 307-314.

Nielsen, J.E., Brochert, T.V. (2000) Biochim. Biophys. 1543, 253-274.

Nouaimi, M.; Moeschel K.; Bisswanger, H. (2001) Enzyme Microbiol. Technol. 29, 576-574.

Nouaimi, M. (2003) Dissertationschrift, Universität Tübingen.

O'Discroll. K.F. (1987) in: Methods Enzymol. Vol. XLIV, Mosbach, K. [Hrsg]. S. 19-45, Academic, New York

Oshima, T; Imahori, K (1971) J. Gen. Appl. Microbiol. 17, 513-517.

Pace, C.N.; Grimseley; G.R.; Thomson, J.A.; Barnett, B.J. (1988) J.Biol.Chem. 263, 11820-11825.

Pantazaki, A.A.; Pritsa, A.A.; Kyriakidis, D.A. (2002) Appl. Microbiol. Biotechnol. 58, 1-12.

Peczynska-Czoch, W.; Mordarski, M. (1988) Actinomycete enzymes, 219-283. Goodfelow, M.; Williams, S.T.; Modarski; M. [Hrsg.] In: "Actinomycetes in Biotechnology". Academic Press, San Diego, Calif***. s.o***.

Plon, F.J.; Ballesteros, A. (1994) FEBS Lett 339, 200-204.

Price, C.P. Enzymes as reagents in clinical chemistry, 411-422. Phil Transact Royal Soc B 300.

Pridham, T.G., Tresner, H.D. (1974) in: "Bergey's manual of *systematic* determinative Bacteriology", Buchanan, R.E., Gibbons, W.E. [Hrsg.], Williams & Wilkins, Baltimore, 747-748.

Raykovska, V.; Dolashka-Angelova, P.; Paskaleva, D.; Stoeva, S.; Abashev, J.; Kirkov; L.; Voelter, W. (2001) Biochem. Cell. Biol. 79, 195-205.

Renko, M.; Vitale, L.j.; Kokalj, M.; Pokorney, M. (1989) Appl. Microbiol. Biotechnol.

31, 38-44.

Sakiyama, H., Nishino, Y., Tanaka, T., Tomosawa, T., Kinoshita, H., Nagata, K., Schieber, K., Sakiyama, S. (1989) Biochem. Biophys. Acta 990, 156-161.

Sanglier, J.J.; Haag, H.; Huck, T.A.; Fehr, T. (1993) Research Microbiol. 144, 633-642.

Schreier, H. (1984) Pharmazie in unserer Zeit, 11, 97-103.

Scopes, R.K. (1988) “Protein Purification Principles and Practice”, Springer Verlag, New York.

Senhaji, S. (2000), Diplomarbeit, Universität Tübingen.

Shida, O.; Takagi, H.; Kadowaki, K.; Nakamura, L.K.; Komogata, K. (1997) Int. J. Syst. Bacteriol. 47(1), 289-298.

Sidhu, S.S.; Kalmar, G.B; Willis, L.G., Borgford, T.J. (1994) J. Biol. Chem. 269, 20167-20171.

Singleton, R.; Amelunxen, R.E. (1973) Bacteriol. Review 37, 320-342.

Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke,N.M.; Olsin, B.J.; Klenk,D.C. (1985) Anal. Biochem. 150, 76-85.

Stetter, K.O. (1986) in: „Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiology”. Brock, T.D. [Hrsg.], Wiley, New York, 40-74**.**

Tangam, E.B., Rajkumar, G.S. (2002) Biotechnol. Appl. Biochem. 35 149-154.

Tadao, O.; Kazuya, Y.; Takayuki, K.; Noriyuki, K.; Kenji, S. (2001) Eur. J. Biochem. 268, 4375-4383

Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979) Biochemistry 76, 4350-4354.

Toogood, H.S.; Smith, C.A.; Baker, E.N.; Daniel, R.M. (2000) J. Biochem 350, 321-328.

Ulbrich, R. [Hrsg.] (1989) in: „Enzymkatalyse“, VEB Gustav Fischer Verlag,

Jena, 298-341.

Wachsmuth, E. D.; Fritze, I.; Pfleiderer, G. (1966), Biochemistry 5, 169-174.

Wagstaff, C.; Leverentz, M.K.; Griffiths, G.; Thomas, B.; Chanasut, U.; Stead, A.D.; Rogers, H.J. (2002) J. Exp. Botany 53(367), 233-240.

Waksman, S.A., Lechevalier, H.A. [Hrsg.] (1953) in: “Guide to the Classification and Identification of the Actinomycetes and their Antibiotics”, Williams & Wilkins, Baltimore.

Wittrisch, H.; Schröer, H.-P.; Vogt, J.; Vogt, C. (1998), Electrophoresis 19, 3012.

Williams, S.T.; Goodefellow, M.; Alderson, G.; Wellington, E.M.T.; Sneaht, P.H.A.; Sackin, M.J. (1983) J. Gen. Microbiol. 129, 1743-1813.

Woese, C.R.; Kandler, O., Wheelis, M.L., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci., 87, 4576-4579.

Woese, C.R. (1996) Current Biology, 6, 1060-1063.

Yeoman, K.H., Edwards, C. (1997) Appl. Microbiol. 82, 149-156.

Zeikos, J.G.; Vielle, C.; Savchenko, A. (1998) Extermophiles 2, 179-183.

Zillig, W.; Stetter, K.O.; Wunderl, S:; Schulz, W.; Priess, H.; Scholz, I: (1980), Arch. Microbiol. 125, 259-269.

Meine akademischen Lehrer waren:

Prof. Dr. K. Albert, Prof. Dr. H. Bisswanger, Prof. Dr. P. Boley, Prof. Dr. K. Eisele, Prof. Dr. G. Gauglitz, Prof. Dr. H. Hagenmaier, Prof. Dr. B. Hamprecht, Prof. Dr. H.A. Mayer, Prof. Dr. W.E. Mayer, Prof. Dr. D. Mecke, Prof. Dr. U. Nagel, Prof. Dr. D. Oelkrug, Prof. Dr. P. Overath, Prof. Dr. W. Pfeiffer, Prof. Dr. K. Poralla, Prof. Dr. H. Probst, Prof. Dr. K. Reutter, Prof. Dr. M. Schwarz, Prof. Dr. H. Stegmann, Prof. Dr. J. Strähle, Prof. Dr. W. Voelter, Prof. Dr. K. Wegmann, Prof. Dr. B. Wohlleben

Lebenslauf

Name:	Saida Senhaji- Dachtler
Geboren:	09. Juni 1971 in Moers
Familienstand:	verheiratet
Staatsangehörigkeit:	marokkanisch
Wohnort:	Hoferinweg 45, 89155 Erbach

Ausbildung:

1977-1980	Grundschule Moers, Deutschland
1980-1985	Grundschule Taza, Marokko
1985-1992	Collége Ali Ben Bari Taza, Marokko
1992-1993	Immatrikulation an der Fakultät für Betriebswirtschaftslehre an der Mohammed V.-Universität, Oujda, Marokko
1993-1994	Studienkolleg für ausländische Studierende an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn
1995-2001	Biochemie-Studium an der Eberhard-Karls Universität, Tübingen Diplomarbeit am Physiologisch-Chemischen Institut bei Herrn Prof. Dr. H. Bisswanger mit dem Thema “Immobilisierung und Charakterisierung einer neuen thermophilen Protease an Polyestervlies”
März 2001	Abschluss als Diplom-Biochemikerin
2001-2005	Dissertation an der Eberhard-Karls Universität, Tübingen am Physiologisch-Chemischen Institut unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Bisswanger über das Thema „Extrazelluläre Proteasen aus Mikroorganismen: Reinigung, Charakterisierung und Fixierung auf Polyester“